

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

UNIDAD DE POST GRADO

**Vigilancia dirigida de influenza aviar en aves silvestres
de los humedales de Puerto Viejo usando patos
domésticos (*Cairina moschata*) como centinelas**

TESIS

para optar el grado de magíster en Salud Animal

AUTOR

Juan Alexander Rondón Espinoza

Lima-Perú

2011

Dedicado a:

Mis padres Tula y Manuel, viejitos desde aquí
les mando esta dedicatoria con todo mi amor
para ustedes que están en el cielo.
Mis hermanos Manuel y Alfredo, les agradezco
por haber compartido el tiempo de mi niñez con
ustedes, un abrazo imaginario para los dos.
Mis hermanos Erwin, Tula, Ricardo e Ysabel,
a ustedes que comparten conmigo su cariño,
sus alegrías y tristezas..., los quiero mucho.
Mis sobrinos Miguelito, Yair y Franco, a ustedes
que con sus travesuras me hicieron volver a mi
niñez, haciéndome reír.
¡Gracias a ustedes por ser mi familia!

Este trabajo también está dedicado a ti joven estudiante;

- Que, desde muy niño tuviste muchos obstáculos y problemas por muchos motivos y, cuando creciste tuviste carencias de comodidades, pero a la vez fuiste consciente de eso y supiste afrontarlo de alguna manera, no dejando de luchar por alcanzar tus metas.
- Que, supiste encontrar solo tu camino con ayuda de tus seres queridos, y que a pesar de quererlos mucho, no fuiste un hijito de papá, ni de mamá.
- Que, para avanzar supiste agradecer y retribuir todo lo que te dieron alguna vez las personas cercanas (familia, amigos, conocidos, etc.).
- Que, para trabajar en grupo, siempre ofreciste y ofreces buena voluntad, dedicación, y sobretodo cumpliste con la ley del amor impersonal, dando lo mejor de ti en todo lo que haces.
- Que, hiciste y sigues haciendo de los obstáculos un motivo para prepararte más, haciéndote más fuerte en conocimiento, afirmando tu templanza.

Por todos o alguno de estos motivos te dedico este trabajo estimado estudiante, porque eres un ser valioso y, recuerda:

Que aportas mucho más con tu calidad humana, que con tu grado de conocimiento; porque al final el conocimiento se adquiere, la calidad humana se forja.

Agradecimientos:

A Dios por estar siempre conmigo y darme los dones de la perseverancia y la paciencia para cumplir con este noble objetivo.

A la Dra. Eliana Icochea, por su apoyo incondicional y guiarme durante todo este tiempo, por su amistad y sobretodo por sus palabras de aliento que hicieron posible la culminación del presente trabajo.

Al Dr. Armando González, por su apoyo y por su paciencia durante todo este tiempo.

A Rosa González por su apoyo y guiarme durante todo el tiempo del estudio.

A los Doctores; Raúl Rosadio, Hermelinda Rivera, Francisco Suarez, Sonia Calle y Pablo Reyna, por su orientación y ayuda a la culminación del presente trabajo.

Al personal de la Empresa Avícola San Fernando especialmente al Dr. Guillermo Lí, por todas las facilidades brindadas para la realización del presente trabajo.

Al personal de la Administración de los humedales de Puerto Viejo, especialmente al Sr. Miranda, por las facilidades de alojamiento y orientación en el lugar de la investigación

A Carlos Angulo, por su ayuda en la realización del procesamiento de datos en el presente trabajo.

A Bruno Gherzi, por ser parte desde el inicio de este gran proyecto.

A la Srta. Jessica, por su ayuda y orientación en todos los trámites concernientes a la tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica - CONCYTEC, por haber financiado todos mis estudios durante la maestría.

CONTENIDO

Tabla de contenido.....	iv
Lista de Cuadros.....	viii
Lista de Tablas.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Anexos.....	x
Terminología.....	x
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
 I.- INTRODUCCIÓN.....	 1
 II.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	 5
INFLUENZA AVIAR.....	
2.1 DEFINICIÓN.....	5
2.2 HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	5
2.3 IMPACTO ECONÓMICO.....	10
2.4 IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA.....	11
2.5 ETIOLOGIA.....	12
2.5.1 Clasificación.....	12
2.5.2 Morfología y estructura viral.....	13
2.5.3 Composición química.....	15
2.6 EVOLUCIÓN FILOGENÉTICA DE LOS VIRUS.....	15
2.7 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	17
2.7.1 Factores de riesgo para la difusión de los virus.....	17
2.7.2 Ecología de los virus.....	19
2.7.2.1 En aves domésticas y silvestres.....	19
2.7.2.2 En el medio ambiente.....	21
2.7.2.3 Presencia de humedales.....	22
2.7.3 Huéspedes y reservorios.....	23
2.7.4 Susceptibilidad de especies.....	24
2.7.5 Rol de las aves silvestres en la propagación de los VIA.....	25
2.7.5.1 Migraciones de aves silvestres.....	26
2.7.5.2 Prevalencia de la infección por VIA en aves silvestres.....	31
a).- Patrón espacial.....	33
b).- Patrón temporal.....	35
2.7.5.3 Distribución de poblaciones de aves silvestres en los humedales de la Costa central del Perú.....	35
2.8 TRANSMISIÓN.....	42

2.9	PATOGENESIS	44
2.9.1	Características antigénicas	45
2.9.2	Entrada viral y replicación	45
2.9.3	Variación antigénica y respuesta inmune	47
2.9.3.1	Variación antigénica	47
2.9.3.2	Respuesta inmune	52
2.9.4	Efecto patogénico	53
2.10	MANIFESTACIONES CLÍNICO - PATOLÓGICAS	54
2.10.1	Signos clínicos	54
2.10.2	Lesiones patológicas	56
2.11	DIAGNOSTICO DIFERENCIAL	57
2.12	DIAGNOSTICO DE LABORATORIO	58
2.12.1	Aislamiento viral e identificación del agente	60
2.12.2	Cálculo de la patogenicidad	61
2.12.3	Pruebas serológicas	62
a).-	Agar Gel Inmunodifusión (AGID)	62
b).-	Hemaglutinación (HA) Inhibición de la Hemaglutinación (IH) e Inhibición de la Neuraminidasa (IN).	63
c).-	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	63
2.12.4	Captura de antígeno y técnicas moleculares	64
2.13	PREVENCIÓN, BIOSEGURIDAD Y CONTROL	65
2.13.1	Prevención	65
2.13.2	Bioseguridad	67
2.13.3	Control y erradicación	68
2.13.3.1	Control	68
a).-	Sistema de emergencia o Plan de contingencia	69
b).-	Cuarentena y profilaxis sanitaria	71
c).-	Diagnóstico de laboratorio	72
d).-	Control de tránsito o movimientos	72
e).-	Sacrificio de animales afectados	73
f).-	Vacunación estratégica	73
2.13.3.2	Erradicación	78
2.14	TRATAMIENTO	78
2.15	VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA	78
2.15.1	Objetivos	79
2.15.2	Requisitos para la vigilancia de la enfermedad	80
2.15.3	Tipos de vigilancia epidemiológica	81
2.15.4	Vigilancia epidemiológica de acuerdo al status de la enfermedad	81
2.15.5	Vigilancia epidemiológica en aves	82
2.15.5.1	En aves domésticas	82
2.15.5.2	En aves silvestres	83
2.16	USO DE AVES CENTINELAS PARA LA VIGILANCIA DE LA	

	ENFERMEDAD	85
2.17	MEDIDAS ADOPTADAS POR ALGUNOS PAISES PARA CONTRARRESTAR LA ENFERMEDAD	88
2.18	SITUACION DE LA INFLUENZA AVIAR EN EL PERU	88
III.-	MATERIALES Y METODOS	91
3.1	MATERIALES	91
3.1.1	Material y equipo de laboratorio	91
3.1.1.1	Para la colección de muestras	91
a).	Hisopados cloacales	91
b).	Sueros	91
3.1.1.2.	Para las pruebas de diagnóstico	91
3.1.1.3.	Para la extracción de suero	91
3.1.2	Reactivos e insumos de laboratorio	92
3.1.2.1	Para la colección de muestras	92
3.1.2.2.	Para las pruebas de diagnóstico	92
3.1.3	Material auxiliar	92
3.1.3.1	Para la identificación del lugar de estudio y descripción de resultados	92
3.1.3.2	Para el registro y evaluación de animales	92
3.1.4	Material biológico	93
3.1.5	Animales de estudio	93
3.1.5.1	Determinación de la especie de animales para el estudio	93
3.1.5.2	Determinación de la cantidad de animales a usar y tiempo de estudio	93
3.1.6	Recursos humanos disponibles	94
3.2	MÉTODOS	
3.2.1	Preliminares	
3.2.1.1	Criterios tomados para la implementación de la metodología usada	94
3.2.1.2	Lugar de estudio (área de investigación y evaluación)	95
a).	Descripción geográfica y ecológica de los humedales	95
a.1).	Descripción geográfica	95
a.2).	Descripción ecológica (fauna silvestre)	96
3.2.1.3	Periodo de estudio (fundamentación del tiempo de evaluación)	96
3.2.1.4	Manejo de los animales de estudio	97
3.2.1.5	Seguimiento de las aves	97
3.2.2	Evaluativos	97
3.2.2.1	Evaluación clínica	97
3.2.2.2	Evaluación de laboratorio	98

a).	Evaluación de la presencia de viral	98
b).	Evaluación serológica	98
3.2.3	Toma de muestras	98
3.2.3.1	Hisopado cloacal	98
3.2.3.2	Suero	99
3.2.4	Procesamiento de muestras	99
3.2.4.1	Para aislamiento viral	99
a).	Inoculación en huevos embrionados	99
a.1).	Preparación del inóculo	100
a.2).	Procedimiento de inoculación	100
a.3).	Cosecha del fluido alantoideo	100
b).	Procesamiento del fluido alantoideo	101
3.2.4.2	Pruebas de detección de anticuerpos	102
a).	Prueba de AGID	102
b).	Prueba de IH	102
3.2.5	Descripción de resultados	103
3.2.6	Análisis de datos	103
IV.-	RESULTADOS	105
4.1	Resultados Preliminares	
4.1.1	Identificación visible de factores de riesgo probables para la transmisión de los VIA durante el estudio	105
4.1.2	Comportamiento e interacción de los patos centinelas con las especies de aves silvestres residentes	107
4.1.2.1	Lineamientos considerados en la evaluación	107
4.1.2.2	Resultados de la evaluación del comportamiento e interacción	107
4.2	Resultados propios de la evaluación en el estudio	108
4.2.1	Determinación del estado clínico y de infección compatible con la infección por VIA en las aves centinelas	108
4.2.2	Resultado de la inoculación de huevos embrionados para el aislamiento viral	108
4.3	Modelo Estadístico de los datos	109
V.-	DISCUSIÓN	110
VI.-	CONCLUSIONES	122
VII.-	RECOMENDACIONES	123
VIII.-	BIBLIOGRAFIA CITADA	124
IX.-	ANEXOS	152

Lista de cuadros

De la Revisión de Literatura

Cuadro 01.	Brotos de Influenza Aviar en Asia, Europa, África y Oceanía desde 1959 hasta el 2004 asociados a las cepas altamente patógenas H5, H7 y bajamente patógena H9.....	08
Cuadro 02.	Brotos y casos importantes de Influenza Aviar en el continente americano desde 1959 hasta el 2006.....	09
Cuadro 03.	Informes de casos de IAAP por H5N1 en aves silvestres en los años 2004 y 2005 en países de Asia.....	09
Cuadro 04.	Factores de Riesgo para la presentación de la IAAP en Asia.....	19
Cuadro 05.	Especies migratorias identificadas que viajan entre Norte y Sudamérica según orden y familia.....	31
Cuadro 06.	Prevalencia de VIA tipo A en aves silvestres.....	32
Cuadro 07.	Origen de las aves silvestres de los humedales de la costa central.....	36
Cuadro 08.	Especies de aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo.....	37
Cuadro 09.	Características de las pruebas de diagnóstico selectas para los VIA.....	59
Cuadro 10.	Condiciones físicas y químicas de sobrevivencia e inactivación de los VIA.....	71
Cuadro 11.	Ventajas y límites de las vacunas contra IA comúnmente permitidas en el mercado contra los criterios de una vacuna ideal.....	75
Cuadro 12.	Campañas de vacunación contra Influenza Aviar establecidas en países.....	77

De los materiales y métodos

Cuadro 01.	Cronograma periódico de muestreo de las aves centinelas.....	98
Cuadro 02.	Pruebas desarrolladas para la detección viral y determinación de la seroconversión.....	99

Lista de Tablas

Tabla 01.	Especies de aves silvestres identificadas durante el tiempo de evaluación.....	105
Tabla 02.	Detección de anticuerpos y aislamiento viral en suero e hisopado cloacal.....	108
Tabla 03.	Aplicación de la prueba de Goal Seeking en los datos obtenidos del estudio.....	109

Lista de figuras

Figura 01. Países afectados por brotes de Influenza Aviar H5N1 hasta el 2008.....	07
Figura 02. Conformación del Virus de Influenza Aviar.....	14
Figura 03. Rutas migratorias de aves silvestres en el mundo.....	30
Figura 04. Disposición de la HA y NA de los VIA en la célula hospedera.....	46
Figura 05. Ciclo de replicación de los VIA.....	48

Lista de anexos

Anexo 01. Grupos de animales usados para el desarrollo de la investigación.....	152
Anexo 02. Toma de muestras de hisopado cloacal de las aves centinelas.....	153
Anexo 03. Toma de muestra de sangre de las aves centinelas.....	153
Anexo 04. Procesamiento de las muestras de hisopado cloacal en laboratorio.....	154
Anexo 05. Ubicación de los humedales de Puerto Viejo.....	155
Anexo 06. Plano de los humedales de Puerto Viejo.....	156

TERMINOLOGÍA

AGID.-	Agar Gel Inmunodifusión
ALA.-	Asociación Latinoamericana de Avicultura
APA.-	Asociación Peruana de Avicultores
ARN.-	Ácido Ribonucleico
ARN _m .-	Ácido Ribonucleico mensajero
DIVA.-	Diferencia entre animales vacunados de infectados
ENC.-	Enfermedad de Newcastle
EIA-AC.-	Inmunoensayo enzimático de captura de antígeno
FAO.-	Organización para la agricultura y alimentación de las naciones unidas
FMV.-	Facultad de Medicina Veterinaria
H.-	Hemaglutinina
HA.-	Hemaglutinación directa
HA1.-	Sitio de partición de la hemaglutinina 1
HA2.-	Sitio de partición de la hemaglutinina 2
IA.-	Influenza aviar
IAAP.-	Influenza aviar altamente patógena
IAAPDO.-	Influenza aviar altamente patógena de declaración obligatoria
IABP.-	Influenza aviar bajamente patógena
IABPDO.-	Influenza aviar bajamente patógena de declaración obligatoria
IABPN.-	Influenza aviar bajamente patógena notificable
IAMP.-	Influenza aviar moderadamente patógena
IAN.-	Influenza aviar notificable
Ig M.-	Inmunoglobulina M
Ig G.-	Inmunoglobulina G
IH.-	Inhibición de la hemaglutinación
IN.-	Inhibición de la Neuraminidasa
IPIV.-	Índice de patogenicidad intravenosa
LT.-	Laringotraqueitis Infecciosa
M.-	Matriz
M1.-	Proteína de membrana 1
M2.-	Proteína de membrana 2
N.-	Neuraminidasa
NC.-	Nucleocápside
NP.-	Nucleoproteína
NS1.-	Proteína no estructural 1
NS2.-	Proteína no estructural 2
OIE.-	Oficina Internacional de Epizootias

OMS.- Organización Mundial de la Salud
OPS.- Organización Panamericana de la Salud
PA.- Proteína A
PB1.- Proteína de unión 1
PB2.- Proteína de unión 2
PBS.- Solución salina amortiguada de pH
PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa
RNP.- Ribonucleoproteínas
RT PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa
RT PCR *tr*.- Reacción en cadena de la polimerasa - transcriptasa reversa en tiempo real
SENASA.- Servicio Nacional de Sanidad Agraria
SPF.- Huevos embrionados libres de patógenos específicos
UE.- Unión Europea
UHA.- Unidad Hemaglutinante
UNMSM.- Universidad Nacional Mayor San Marcos
VI.- Virus de Influenza
VIA.- Virus de Influenza Aviar
VIAAP.- Virus de Influenza Aviar altamente patógena
VIABP.- Virus de Influenza Aviar bajamente patógena

RESUMEN

Se aplicó un método de vigilancia dirigida para la detección temprana del Virus de Influenza Aviar (VIA) en aves silvestres de los Humedales de Puerto Viejo, Provincia de Cañete, Departamento de Lima, Perú. Como centinelas se usaron 12 patos domésticos de 16 semanas de edad, variedad Muscovy (*Cairina moschata*), negativos por serología y aislamiento viral, los cuales fueron introducidos a las zonas que circundan los humedales por un periodo de 70 días durante el invierno del 2006, con el fin de que interactúen con las aves silvestres residentes. Se realizó una identificación preliminar de las especies de aves silvestres presentes durante el estudio y se determinó subjetivamente el grado de interacción entre ambas poblaciones de aves. Se evaluó el estado sanitario de las aves centinelas mediante exámenes clínicos periódicos, muestreos de hisopados cloacales y sangre, tanto para aislamiento viral como para la detección de anticuerpos contra los VIA por la prueba de inmunodifusión en agar. A lo largo del estudio no se detectaron anticuerpos ni se aisló VIA. Los resultados negativos obtenidos en las evaluaciones realizadas bajo las condiciones y tiempo que duro el estudio, sugieren la ausencia del VIA y su transmisión horizontal por las poblaciones de aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo.

Palabras clave: Influenza Aviar, Vigilancia dirigida, humedales, aves silvestres, aves centinelas, interacción, transmisión horizontal.

ABSTRACT

We applied a targeted surveillance method for early detection of **Avian Influenza Virus** (AIV) in wild birds in the Wetlands of Puerto Viejo, Province of Cañete in Lima - Peru. As sentinel domestic ducks were used 12 to 16 weeks of age, variety Muscovy (*Cairina moschata*), and negative by serology and virus isolation, which were introduced to areas surrounding wetlands for a period of 70 days during the winter of 2006, to interact with resident wild birds. We conducted a preliminary identification of species of wild birds present during the study and was determined subjectively the degree of interaction between the two bird populations. We assessed the health status of the sentinel birds through regular clinical examinations, cloacal swab samples and blood for both virus isolation for detection of antibodies against VIA by the AGID test. Throughout the study was not detected or isolated antibodies VIA. The negative results of evaluations performed under the conditions and time of the study suggest the absence of VIA and horizontal transmission by wild birds in wetlands of Puerto Viejo.

Key words: Avian Influenza, targeted surveillance, wetlands, wild birds, sentinels birds, interaction, horizontal transmission.

I.- INTRODUCCIÓN

El continente Americano es el primer productor mundial de aves de corral, contando actualmente con una población aproximada de 4850 millones de aves (ALA). En el Perú la avicultura es el sector pecuario más importante, con una población de aproximadamente 80,000'000 unidades agrarias en aves (INEI). Este sector está distribuido entre crianza tecnificada, crianza de traspatio y aves de riña; asimismo las más grandes poblaciones se ubican principalmente en la costa (APA).

Durante la última década, la Influenza Aviar (IA) ha tenido un impacto desastroso en un número creciente de países. Según estimaciones 200 millones de aves de corral han muerto o han sido eliminadas en lugares afectados distribuidos en todo el mundo (FAO, 2007*b*); amenazando los modos de vida de cientos de millones de ganaderos pobres, pequeños empresariados y la producción comercial de aves de corral, con un serio impacto sobre el comercio regional e internacional y las oportunidades de mercado (SENASA, 2005).

Según Nin Pratt y Falconi, (2006) si la enfermedad se presenta en América Latina y el Caribe, quedaría comprometida la seguridad alimentaria de los países más vulnerables de la región. En el caso del Perú el 70% la proteína animal que se consume proviene del sector avícola, y la epidemia tendría un fuerte impacto en este sub-sector agropecuario (APA).

La prevención es el arma más eficaz para evitar daños mayores y mantener el estado libre de la IA, en ese sentido en Abril del 2005 la FAO y la OIE promovieron una red científica mundial para apoyar a los servicios veterinarios en su control; donde

uno de los objetivos fue promover la investigación relacionada a los riesgos asociados con la enfermedad (Martin *et al.*, 2007). De igual manera en Mayo del 2006, la Conferencia Científica Internacional sobre IA y avifauna silvestre organizada por la FAO en Roma, concluyó que las aves silvestres y domésticas podrían participar en la propagación y persistencia de los virus H5N1, por tanto la lucha contra este problema debía centrarse fundamentalmente en su prevención en este grupo.

Varios organismos crearon una serie de publicaciones para una adecuada vigilancia de la enfermedad (OPS, 2006; Wetlands International Globalsite, 2007; OIE, 2009); asimismo en Latinoamérica miembros de la FAO y ALA, crearon manuales para difundir la bioseguridad en crianzas de pequeña y gran escala. En ese sentido la Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe llevaron a cabo actividades destinadas a la detección precoz y su prevención (FAO, 2007*b,c*).

Los informes de brotes de la enfermedad son preocupantes. Según la FAO (2007*b*) las aves silvestres particularmente acuáticas están expandiendo los virus H5N1 hacia regiones hasta ahora libres de la enfermedad. En los últimos años, la emergencia y dispersión de los Virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (VIAAP) H5N1 en Asia, ha elevado la atención acerca de su potencial expansión a las Islas del Pacífico y América (Rivera, 2006; PIF & WO, 2006). Estas aves portan los Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (VIABP) asintóticamente, transmitiéndolos y causando una enfermedad leve en las aves de corral, sin embargo después de un tiempo estos virus pueden mutar y volverse altamente patógenos causando epidemias graves (OIE/FAO/IZSVE y UE, 2007).

Aunque las rutas migratorias de aves silvestres de los continentes americanos y euroasiático son relativamente independientes, las de Asia oriental a Alaska o las rutas desde Islandia vía Groenlandia hacia el norte de Canadá, podrían conducir a la introducción de los virus a América, y extenderse por las rutas migratorias norte/sur desde el Ártico a Tierra del Fuego (FAO, 2007*a*). Afortunadamente hasta el momento en América, las cepas H5N1 altamente patógenas no han sido detectadas; pero si se han encontrado cepas H5N1 que no han experimentado los cambios patogénicos de las cepas asiáticas de este subtipo; no obstante su rol en la dispersión a las aves domésticas está pobremente documentado (Whitworth *et al.*, 2007).

Cabe señalar que el desarrollo de los brotes en América desde el Norte hacia el Sur, coinciden con la ruta de migración de aves silvestres terrestres y acuáticas; sugiriendo a los investigadores que estas son las formas más importantes de transmisión

de los virus a los planteles de aves comerciales (Martins, 2003); por este motivo en Latinoamérica se incrementó la atención con la entrada de la IAAP e igualmente con la necesidad de asistencia a los lugares afectados (FAO, 2006a).

Por otra parte en todo el mundo se adoptaron medidas para vigilar la ocurrencia y características de los VIABP en aves silvestres migratorias (Stallknecht & Brown, 2007); sobretodo por la posibilidad de que algunas especies puedan ser reservorios permanentes de los virus H5N1 sin manifestar signos clínicos (OIE, 2008); de igual manera estudios en Asia concluyeron que los patos domésticos aparentemente sanos pueden excretar los virus durante largos periodos de tiempo, y que la cepa H5N1 tiene un periodo de vida más largo en el medio ambiente (Capua y Alexander, 2005; CENAVECE).

En los últimos años, brotes por variantes de los virus altamente patógenos que no tienen relación con la cepa H5N1, ocurrieron en aves de corral en Canadá, Chile, El Salvador, Estados Unidos, Guatemala y México (Wetlands International Globalsite, 2007). En el Perú desde inicios del milenio se comenzó a dar más importancia a la vigilancia de IA, debido al brote de Chile en el 2002, y la detección de anticuerpos contra el virus en Colombia en el 2005; afortunadamente la enfermedad no ha sido reportada en el país, y su prevención se normó en un plan de contingencia contra la IA creado por el SENASA en el 2005.

Asimismo el refuerzo de la información sobre los VIAAP, para fortalecer los planes de alerta precoz y reacción temprana ante una eventual introducción por las aves silvestres acuáticas migratorias residentes temporales y permanentes es importante (FAO, 2007d); en este sentido CENAVACE mencionó que los países localizados a lo largo de las rutas migratorias necesitan vigilar a sus aves silvestres y domésticas en busca de signos de la enfermedad; asimismo a sus aves migratorias locales dentro de una sub-región, que podrían contribuir a la propagación del virus si estuviera presente en el continente (FAO, 2007a).

En este sentido la vigilancia epidemiológica, la bioseguridad y la vacunación juegan un rol importante en la prevención y control de la enfermedad (Kelly *et al.*, 2008); y en zonas con riesgo de introducción del virus, la bioseguridad y la vigilancia epidemiológica deben ser reforzadas para evitar su propagación a la avicultura comercial (SENASA, 2005).

La centinelización puede aplicarse como un método de vigilancia en poblaciones libres y no libres de la enfermedad (OIE, 2009). En esa línea la FAO (2007*b*) menciona que esta podría ser considerada un tipo de vigilancia dirigida basada en el riesgo a su presentación; por otra parte el USDA, (2006) menciona que el uso de patos centinelas en colonias de aves silvestres, mejoró la tasa de detección viral en cinco veces más, sugiriendo que este enfoque tiene sus ventajas para los estudios ecológicos de la enfermedad.

En el Perú, paralelamente al inicio de un proyecto de vigilancia directa de los VIA en aves silvestres en la costa central, se desarrolló un sistema de vigilancia dirigida mediante centinelización para la detección temprana de la enfermedad.

El presente estudio tuvo por objetivo general contribuir a la vigilancia epidemiológica del Virus de Influenza Aviar (VIA) en la población de aves silvestres en el Perú, y como objetivo específico evaluar la presencia de VIA en la población de aves silvestres residentes en los humedales de Puerto Viejo, usando patos centinelas como método de vigilancia dirigida.

II.- REVISIÓN DE LITERATURA

INFLUENZA AVIAR

2.1 DEFINICIÓN

La IA es una enfermedad infecciosa viral altamente contagiosa causada por algunos de los diversos VIA tipo A (OIE, 2009). Estos virus son comunes en aves silvestres y a veces infectan a aves de corral, sin embargo en estas últimas la infección puede ser asintomática, producir cuadros leves o manifestaciones clínicas severas (García *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007). La enfermedad es considerada dentro de la lista A de enfermedades por la OIE, y está sujeta a notificación obligatoria internacional.

2.2 HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La enfermedad inicialmente fue reportada en 1878 por el científico italiano Edoardo Perroncito como plaga de las aves de corral o peste aviar, confundiendo con una forma septicémica aguda de Cólera Aviar (Buscaglia, 2004; Marquez, 2007). Posteriormente fue caracterizada patológicamente por Rivolto y Dilprato en 1880, y en 1901 Centani y Savonuzzi determinaron que la causa del problema era un agente filtrable (Swayne y Halvorson, 2003).

En la década de 1920, los brotes de la enfermedad se extendieron a aves comerciales en varios países del mundo, no obstante las medidas de control evitaron un impacto mayor (Easterday *et al.*, 1972). En 1961 en Sudáfrica los virus fueron aislados por primera vez en golondrinas de mar (Swayne y Suarez, 2000); luego en 1965 se identificó al agente como productor de Influenza tipo A, y desde la década de 1970 los

virus fueron aislados de aves silvestres Anseriformes con infecciones asintomáticas como resultado de programas de vigilancia de la ENC (Slemons *et al.*, 1974).

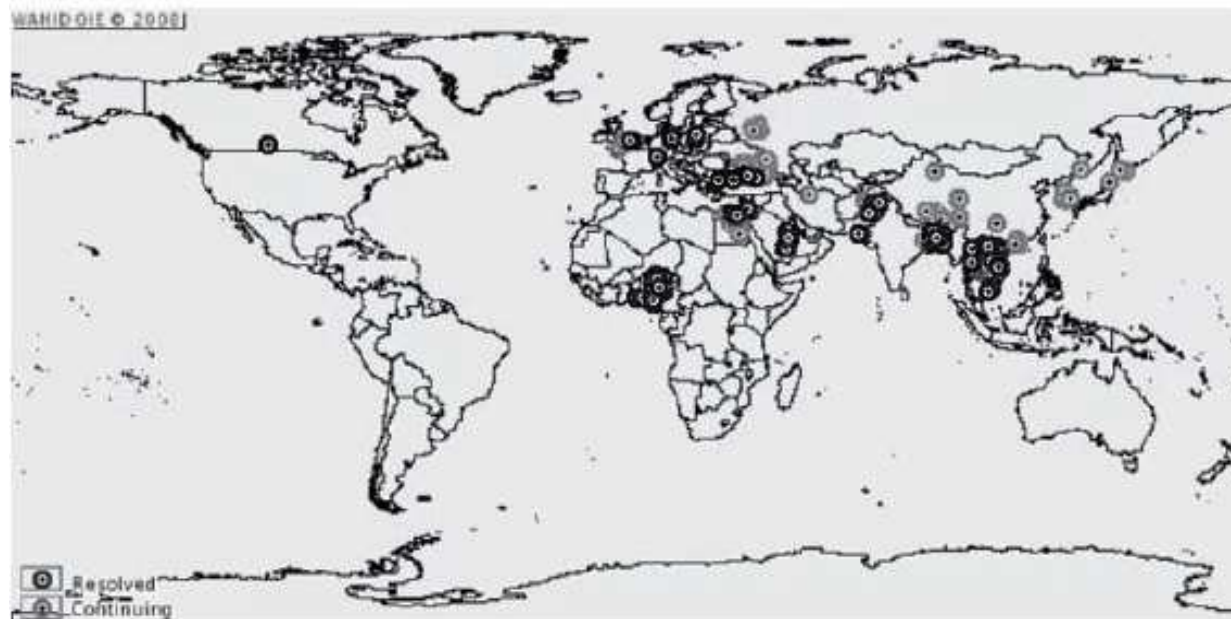
En los siguientes años los VIA se dispersaron en varios países, por el intercambio comercial, la globalización económica, movilización intensa de productos avícolas, los rápidos medios de transporte, la trashumancia de las personas; y la migración estacional de aves acuáticas y terrestres (OIE, 2008). Desde 1955 hasta el 2000 se registraron dieciocho brotes de Influenza Aviar Altamente Patógena (IAAP) en pollos y pavos en diferentes países del mundo (Buscaglia, 2004); esto motivó la elaboración de Simposios Internacionales, dándole a la enfermedad la denominación de Influenza Aviar (Swayne y Halvorson, 2003).

Los problemas más graves y severos en avicultura comercial han sido causados por los subtipos H5 y H7 (Dir. Sanitaria Argentina, 2003) (Cuadro 01); y desde el 2003 los brotes por la cepa H5N1 se propagaron a aves silvestres y domésticas en varias regiones de Asia, parte de Europa, el Pacífico, Oriente Medio y África; con riesgo de producir una pandemia (Monke y Corn, 2007; OIE, 2009) (Figura 01).

En América del Norte y Central se identificaron brotes por virus altamente patógenos que no tienen relación con la cepa H5N1, en Canadá, Estados Unidos, México, Guatemala y El Salvador (OIE, 2008). En Sudamérica se notificó en Chile, y una infección incipiente en la avicultura comercial de Colombia (Senne, 2006; FAO, 2007*d*) (Cuadro 02). Los países de Centroamérica también reportaron presencia de IABP por la cepa H5N2, afectando Guatemala en el 2000, el Salvador en el 2002, y presentándose un foco en República Dominicana y Haití; sin embargo actualmente se encuentran libres de IAAP (Organismo Internacional de Sanidad Agrícola, 2010).

Los brotes de Influenza Aviar Bajamente Patógena (IABP) ocurren frecuentemente en todo el mundo y los de IAAP (H5 y H7) ocurren periódicamente. Las cepas bajamente patógenas se han perpetuado en aves silvestres causando enfermedad leve o grave con diseminación periódica a la industria avícola donde pueden mutar a virus altamente patógenos, divergiendo a diferentes linajes de acuerdo al lugar geográfico (Alexander, 2007*a*). La mayoría de países desarrollados han eliminado la enfermedad de sus aves de corral; sin embargo la epidemia continúa y su erradicación no se espera a corto plazo, porque los virus están presentes en aves silvestres reservorios de todo el mundo (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009) (Cuadro 03).

Figura 01. Países afectados por brotes de Influenza Aviar H5N1 hasta el 2008



Dirección de Producción y Sanidad Animal (FAO) - Actualización sobre IA
en oscuro: brotes resueltos; **en claro:** brotes persistentes.

Cuadro 01. Brotes de Influenza Aviar en Asia, Europa, África y Oceanía desde 1959 hasta el 2004 asociados a las cepas altamente patógenas H5, H7 y bajamente patógena H9

PAIS	ESPECIES	Cepa	AÑO
Escocia	pollos	H5N1	1959
Inglaterra	pollos	H7N3	1963
Australia	pollos	H7N7	1976
Alemania	pollos	H7N7	1979
Inglaterra	pavos	H7N7	1979
Irlanda	pavos	H5N8	1983
Australia	pollos	H7N7	1985
Inglaterra	pavos	H5N1	1991
Australia (Virginia)	pollos	H7N3	1992
Australia (Queensland)	pollos	H7N3	1994
Pakistan	pollos	H7N3	1994
Australia (Nuevo Gales del Sur)	pollos	H7N4	1997
China (Hong Kong)	pollos, patos y gansos	H5N1	1997
Italia	pollos	H5N2	1997
Italia	pollos	H7N1	1999-2000
China (República Popular)	pollos	H9N2	1998-1999
China (Hong Kong)	pollos	H9N2	1999
China (Hong Kong)	NI	H7N7	2003
Holanda	pollos		2003
Bélgica	pollos		
Alemania	NI	H9N2	
China (Hong Kong)	pollos	H5N1	2003
Corea del Sur	patos		2004
Tailandia	gansos		
Camboya			
Vietnam			
China (Hong Kong)			
China (Rep. Pop)			
Japón			
Indonesia			
Laos	pollos	H5N1	
China (Taiwán)	pollos	H5N1	2004
Pakistán			2004

Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2005)

Nota: Según la última actualización de la OIE, los brotes ocurridos desde el 2004 hasta el 2009, en aves de corral superan en número a los presentados en años anteriores.

**Cuadro 02. Brotes y casos importantes de Influenza Aviar
en el continente americano desde 1959 hasta el 2006**

PAIS	ESPECIES	TIPO IA	FECHA
Canadá	aves de corral	H5N9	1966
Estados Unidos	aves de corral	H5N2	1983-1985
México	aves de corral	H5N2	Mayo 1994
Chile	aves de corral	H7N3	Marzo 2002
Canadá	aves de corral	H7N3	Marzo 2004
Estados Unidos	aves de corral	H5N2	Febrero 2004
Colombia *	aves de corral	H9N2	Octubre 2005

* caso ocasionado por una cepa de baja patogenicidad.

Economic Commission for Latin America and the Caribbean (ECLAC, 2005-2006).

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2007b).

Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2008).

**Cuadro 03. Informes de casos de IAAP por H5N1 reportados en aves silvestres
en los años 2004 y 2005 en países de Asia**

PAIS	ESPECIES	TIPO IA	FECHA
China (Hong Kong SAR)	Halcón peregrino, garza gris, gaviota, reidora, gallereta, flamenco	H5N1	ene. 2004
Camboya	Aves silvestres en un zoológico	H5N1	feb. 2004
Japón	Cuervo	H5N1	marz. 2004
República de Corea	Urraca	H5N1	marz. 2004
Tailandia	Pinchón, cigüeña, pequeño cormorán, paloma de color rojo, munia de pecho escamoso, zanate	H5N1	dic. 2004
China (Hong Kong SAR)	Garza gris	H5N1	dic. 2004
China	Ganso de cabeza barrada, gaviota grande de cabeza negra, gaviota de cabeza café, pato colorado y gran comodoro	H5N1	abr. 2005
Mongolia	Ganso de cabeza barrada y cisne	Influenza A subtipo H5	ago. 2005
Rusia (Liberia)	Aves silvestres	H5N1	ago. 2005
Kazajstán	Aves silvestres	H5N1	ago. 2005
Rumania	Cisne	H5N1	oct. 2005

Global Public Health Intelligence Network (GPHIN).

Program for Monitoring Emergency Diseases (FAO, 2007d).

Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2008).

Nota: se ha considerado la información hasta el 2005 para efectos de conocimiento de los casos de IA en aves silvestres para el presente trabajo.

El virus H5N1 sigue siendo un problema global para la industria avícola, porque circula actualmente y continúa evolucionando, dando como resultado variaciones en cuanto al huésped y área geográfica (Webster *et al.*, 2007). Por esto el H5N1 ha manifestado un comportamiento que ha llevado a replantearse el conocimiento existente sobre los VIAAP, esto incluye:

- Producción de mortandad de aves silvestres no asociadas a brotes en aves de corral (Alexander, 2007a).
- Transmisión directa desde aves silvestres a humanos (OMS 2007).
- Transmisión directa desde aves domésticas a aves silvestres migratorias (Webster *et al.*, 2007b).
- Replicación viral principalmente en epitelio traqueal, sugiriendo que la vía respiratoria es importante en la transmisión (Sturm-Ramirez *et al.*, 2005).
- Gran diversidad en la patogenicidad para aves acuáticas desde no patogénica hasta altamente letal (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009).
- Transmisión a carnívoros (félidos y pinnípedos) (Kuiken *et al.*, 2004).
- Desarrollo de endemicidad (OIE, 2008).

2.3 IMPACTO ECONÓMICO

El impacto económico de la IA es variable. La enfermedad puede comprometer varios aspectos como la economía de toda la cadena de producción agropecuaria y las exportaciones, incluyendo la mano de obra y el abastecimiento de proteína animal para la población, sobretodo para los más carentes; sin mencionar la amenaza de la enfermedad como zoonosis (Capua y Marangon, 2006a; Martin *et al.*, 2007); y el daño en la conservación de la naturaleza (Wetlands International Globalsite, 2007).

Según la FAO hasta al 2006, los costos estimados en esfuerzos de erradicación y control de la enfermedad a nivel global sumaron 15524 millones de dólares. La mayoría de los focos y las pérdidas económicas ocurrieron por epizootias de IAAP e involucraron a los subtipos H5 y H7 en avicultura comercial intensiva en pollos y pavos, generando alta mortalidad, morbilidad, costos de diagnóstico, cuarentenas, pagos por indemnización y eliminación de aves del mercado (Swayne y Halvorson, 2003).

Las pérdidas en los países afectados son variables. Por ejemplo; en Australia en 1985 sumaron 2 millones de dólares; en EEUU en los años 1983, 1984 y 2002, murieron 17 millones de aves y se perdieron más de 225 millones de dólares (FAO, 2007d); en México en 1994 se perdieron 50 millones de dólares; en Italia murieron 16 millones de aves entre 1999 y el 2000 perdiéndose 400 millones de euros (Martins, 2003); en China (Hong Kong) en 1997, 1999, 2003 y 2004 las pérdidas por la

enfermedad sumaron 30 millones de dólares (Swayne y Halvorson, 2003); y en los Países bajos murieron más de 25 millones de aves en el 2003 perdiéndose 500 millones de euros (OIE, 2005).

En América Latina la amenaza de esta enfermedad trasciende por su potencial efecto devastador en los planteles afectados y el estado financiero de las empresas avícolas (Martins, 2003); tal es el caso de Chile en el 2002, donde la muerte de aproximadamente 540,000 aves determinaron pérdidas de 31 millones de dólares (Rojas y Moreira, 2002); incluyendo el cierre de las barreras comerciales de países cercanos como Venezuela, Bolivia, Ecuador y Perú (ECLAC, 2005-2006; SENASA-MINSA-MINAG, 2008).

2.4 IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

La IA representa una de las enfermedades más importantes en salud pública. En humanos se ha demostrado que la infección por los virus es transitoria; y para traspasar la “barrera de especie” debe ocurrir un cambio génico mayor (Hidalgo, 2005; Webster *et al.*, 2007a). No obstante este puede producirse de 2 maneras: por recombinación de genes entre diferentes virus propios de la misma especie, y entre virus de diferentes especies de hospederos (Webster y Hulse, 2004).

La transmisión de IA a humanos está documentada, sin embargo no existen evidencias de transmisión directa entre personas. La virulencia de los virus causantes parece relacionarse con varios cambios estructurales en su H (Beigel *et al.*, 2005); esta habilidad para producir brotes epidémicos o pandemias en la población humana radica en las mutaciones productivas; sin embargo estas son muy poco frecuentes (Hidalgo, 2005). Por otra parte la OMS menciona que subtipos en diferentes especies pueden intercambiar o recombinar su material genético y fusionarse, produciéndose pandemias mortales, por su transmisión entre personas durante periodos sostenibles.

Las epidemias de IA en humanos han sido periódicas. En el siglo XX, hubieron 3 ocasiones en donde las variaciones antigénicas de tipo shift produjeron la repentina emergencia de cepas de alta virulencia y patogenicidad entre la población humana, (OMS, 2005). Las cepas comprometidas fueron la H1N1 en 1918, H2N2 en 1957; y H3N2 en 1968; en cada ocasión ocurrió una epidemia de propagación mundial (Hidalgo, 2005).

Por otra parte la difusión de los VIA en salud pública no es determinante. Los virus también pueden esparcirse a través del mercadeo y distribución de productos

alimenticios contaminados tales como carne refrigerada o congelada (Tumpey *et al.*, 2003; Arranz, 2008); sin embargo no existe evidencia epidemiológica de la infección en humanos por consumo de carne cocinada apropiadamente (INFOSAN, 2005). A pesar de esto CENAVECE reporta que el H5N1 tiene un periodo de vida más largo en el medio ambiente, lo que implica también un riesgo en salud pública.

Durante los últimos años se han descrito casos esporádicos de infecciones en personas con la cepa H5N1 en China (Hong Kong), Vietnam y Tailandia; paralelamente a los brotes de enfermedad en aves (Perez- Breña y Casas, 2004; Sanz, 2009). La mayoría tenían estrecho vínculo con la actividad agrícola (ambiente doméstico y laboral promiscuo con aves, comercio de aves vivas, crianza y faenamiento) (Songserm *et al.*, 2006); aunque no se demostró científicamente la transmisión concreta entre humanos para considerar a estos casos como problemas epidémicos, el número de personas infectadas aumenta la probabilidad de que sirvan como “tubo de ensayo” para que emerja un nuevo subtipo que posea los suficientes genes humanos y se transmita fácilmente entre individuos (Taubenberger *et al.*, 2005).

Desde 1998 se ha comprobado que los humanos se infectan directamente de las aves, sin que el virus necesite un periodo de adaptación en la especie porcina (como en los brotes gripales de H5N1 y H9N2) (Godoy, 2006); por esto los expertos mencionan que el inicio de una pandemia de gripe es inevitable e inminente. Finalmente Berrios (2002) menciona que en el mundo fallecen aproximadamente 3,5 millones de personas anualmente debido a infecciones respiratorias agudas que incluyen a la influenza humana, constituyéndose entre las primeras causas de muerte entre todas las enfermedades infecciosas.

2.5 ETIOLOGIA

La IA es causada por los VIA tipo A (Swayne *et al.*, 1998) de la familia Orthomixoviridae, género *Influenzavirus* A (OIE, 2009). Estos virus son también llamados virus de la Gripe A. Dentro de este género Influenzavirus se incluyen a los virus de Influenza humana, equina, porcina y canina, todos estrechamente relacionados (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009). Los *Influenzavirus* B y C (o tipo B y C respectivamente) se han encontrado en humanos y raras veces en focas y porcinos, pero no han sido reportado en aves (Swayne y Halvorson, 2003).

2.5.1 Clasificación

Los virus están tipificados serológicamente por pruebas de precipitación que detectan anticuerpos contra sus proteínas internas principalmente la Nucleocápside

(NC) y Matriz (M) (Swayne y Halvorson, 2003); y se subtipifican de acuerdo a sus 16 Hemaglutininas (H) y 9 Neuraminidasas (N) que determinan su antigenicidad (Swayne *et al.*, 1998). Según Easterday *et al.*, (1997) la nominación científica de los virus incluye; el tipo, hospedero de origen, sitio geográfico, número de cepa (si hubiera) año de aislamiento del subtipo, designando la H y N en paréntesis; por ejemplo; A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2).

Las cepas virales son clasificadas de acuerdo a su alta o baja patogenicidad, y pueden causar cuadros clínicos alta, mediana y bajamente patógenos (OIE, 2009). Las cepas altamente patógenas en su mayoría son de subtipos H5 y H7 (Alexander, 2007a). Las cepas bajamente patógenas pueden ser de otros subtipos e inclusive los de H5 y H7 que se encuentran en la forma bajamente patógena (Ver apéndice 2.12.2), sin embargo estos pueden convertirse en cepas altamente patógenas, produciendo infecciones fatales (CIDRP, 2007; CFSPH/ IICAB / OIE, 2009). Debido a esta variación en la patogenicidad, todos los subtipos H5 ó H7 que son aislados en condiciones de campo son notificables (OIE, 2009).

Finalmente los cuadros clínicos medianamente patógenos, se originan de la mutación de cepas bajamente patógenas en condiciones de campo, evolucionado después de pasajes seriados en las poblaciones de aves comerciales (Buscaglia, 2004).

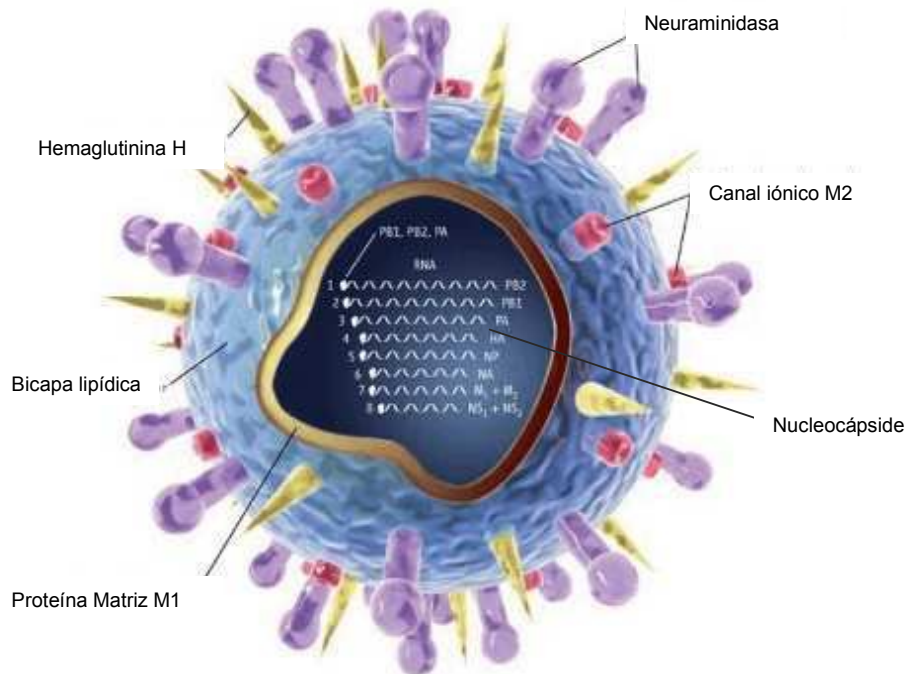
2.5.2 Morfología y estructura viral

Morfológicamente los virus en su mayoría son esféricos y tienen de 80 a 120 nm. de diámetro, aunque también pueden ser filamentosos o pleomórficos y alcanzar entre 400 a 800 nm. de largo (Cox *et al.*; 2000; Noda, 2006).

Estructuralmente presentan una envoltura viral y una nucleocápside. La envoltura externamente tiene una bicapa lipídica derivada de la célula hospedera, con proyecciones de superficie en forma de espículas denominadas peplómeros, constituidos por dos proteínas, una en forma de ruedas la Hemaglutinina (H) y otra en forma de hongos la Neuraminidasa (N); ambas ancladas en la bicapa en relación de 5 a 1 (500 moléculas de H, y 100 de N forman una partícula viral) (Lamb y Krug, 2001).

La envoltura internamente esta cubierta por una proteína matriz, representada por dos tipos de proteínas, la M1 y M2. La primera es mayoritaria y junto con las NP les dan al virus las características antigénicas específicas de tipo A, y la diferencia en el género. La segunda se encuentra en la superficie de la envoltura y forma un canal iónico para la entrada de los virus a la célula (Pinto *et al.*, 1992) (Figura 02).

Figura 02. Conformación del Virus de Influenza Aviar



Noda, 2006

La nucleocápside, esta formada por 8 segmentos de simetría helicoidal con 9 nm. de diámetro, constituido a su vez por dos componentes internos; la ribonucleoproteína (RNP o NP) y el ARN viral al cual se unen 3 polipéptidos PB1, PB2 y PA con actividad polimerasa (Whittaker *et al.*, 1996). Los segmentos tienen cadena simple y son de polaridad negativa. La talla total de todos los segmentos es de 13600 nucleótidos (nt) y portan la información genética para las 10 proteínas virales identificadas (Lamb y Krug, 2001).

Los segmentos del genoma tienen altamente conservados los extremos terminales 5' y 3', y están constituidos por una secuencia común de 12 a 13 nucleótidos (5' AGUAGAAACAAGG) para el género Influenza tipo A (Hulse *et al.*, 2004). En el extremo 3' una secuencia conservada en muchos segmentos (3' UCGUUUUCGUCC) que diferencian los virus humanos del tipo A y del tipo B. Estas secuencias se relacionan con la señal de traducción para replicación del ARN viral. Los segmentos del genoma codifican las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Noda, 2006).

2.5.3 Composición química

Los virus están compuestos de 0.8 a 1.0 % de ARN, 5-8% de carbohidratos, 20% de lípidos y 70% proteínas (Lamb y Krug, 2001). Los carbohidratos están contenidos en de los glicolípidos y glicoproteínas e incluyen a la galactosa, manosa, fucosa y glucosalina; la ribosa está contenida en el genoma viral; y los lípidos están presentes en la envoltura viral y son derivados de la célula hospedera (Swayne y Halvorson, 2003).

2.6 EVOLUCIÓN FILOGENÉTICA DE LOS VIRUS

La divergencia entre los diferentes genes H de los subtipos virales del tipo A ocurrieron hace varios cientos a miles de años. La más temprana divergencia fue estimada 2000 años antes (Yoshiyuki y Masatoshi, 2002). También la divergencia de genes de H entre los virus A y los virus B fue 4000 años antes y la divergencia de los genes de HE (Hemaglutinina - Estereasa) de los virus C fue 8000 años antes (*op. cit.*).

El análisis filogenético y los estudios de secuenciación del genoma de los virus sugieren que las aves acuáticas migratorias mantienen diversas ramas de evolución, manteniendo un estado de latencia evolutiva (FAO-Inforural, 2006; CFSPH/ IICAB / OIE, 2009). Esto se debe a la persistencia de bajas tasas de mutación genética (Gorman *et al.*, 1992; Suarez, 2004); y una limitada tendencia antigénica; actuando como huéspedes por tiempo prolongado, transmitiendo los virus a otras aves silvestres y comerciales o mamíferos (Webster *et al.*, 2007). Las mutaciones no significarían una ventaja selectiva y no serían favorecidas, por lo tanto la emergencia de los VIAAP se reporta casi exclusivamente en hospederos no habituales (por ej. aves domésticas y cerdos) (*op. cit.*)

Los estudios filogenéticos sugieren que los VIAAP han emergido de los VIABP (H5 y H7) por mutación o recombinación (García *et al.*, 1996; Perdue *et al.*, 1997; Clark y Hall, 2006), esto ocurre probablemente después que los virus han circulado en aves domésticas por varios meses (Turner, 2004). Por otra parte Munster *et al.*, (2005) mostraron una diversidad genética menor entre las cepas H5 y H7 de aves silvestres que causaron brotes en aves domésticas en Europa; esto evidencia que la evolución de los virus en hospederos naturales es lenta mientras que en mamíferos es más rápida, posiblemente por la presión selectiva de adaptación viral al nuevo hospedero aberrante tal como lo señalaron Ludwing *et al.*, (1995) y Suarez, (2000).

Cuando los virus muestran una rápida evolución; varían en sus segmentos genómicos, lo que es más aparente en la H y N, divergiendo antigénicamente por la variabilidad genética extensa en su genoma y los externos re arreglos de ancestros

bajamente patogénicos bajo presión de selección apropiada, como en los sistemas de producción de aves (Muzaffar *et al.*, 2006; Webster *et al.*, 2007). Por este motivo en algunos virus de subtipos H5 y H7, las inserciones adicionales de aminoácidos básicos en el sitio de corte de su H pueden dar origen a cepas altamente patógenas (Webster *et al.*, 2007).

Los genes M de los virus procedentes de gaviotas, aves costeras y patos pueden ser potencialmente precursores de virus que causan brotes en avicultura comercial (Widjaja *et al.*, 2004); asimismo el reconocimiento de nuevos subtipos indican que los cambios evolutivos en éstas especies pueden ser mayores, basado en el hecho de que los subtipos H13, H14, H15 fueron identificados en patos silvestres y el H16 en una gaviota marina (Olsen *et al.*, 2006). Por esto el surgimiento de los VIAAP sería un accidente, y no es una ventaja adaptativa para el virus; porque no logra perpetuarse en la naturaleza (quizá con la excepción de los VIAAP H5N1 asiático actual) (Webster *et al.*, 2007).

Los virus de diferentes linajes en aves comerciales o silvestres, parecen divergir más por la base geográfica que por la base temporal ó del hospedero (Rohm *et al.*, 1995; Banks *et al.*, 2000; Alexander, 2007a). Según Webster *et al.*, (2007a) los linajes difieren entre los virus que se encuentran en Europa y Asia a los de América; por otra parte Banks *et al.*, (2000) concluyó que el subtipo H7 divide a los virus originarios de Asia y Europa; con los sub-linajes aislados de Australia; hallazgos similares obtuvo Donatelli *et al.*, en el 2001 con los virus H5.

La divergencia estacional se ha demostrado. Hanson *et al.*, (2005) reportó un fuerte sesgo en patrones de detección viral, después de monitoreos de patos mallards durante el otoño en un estado de USA, concluyendo que la transmisión estacional pueden variar de acuerdo a la especie hospedera, los subtipos y las condiciones ambientales. Por otra parte en Asia se identificó que los virus H5N1 sufrieron re asociaciones genéticas (intercambio de genes) a lo largo de ocho años por coinfecciones en aves silvestres generando diferentes linajes (García, 2009). Finalmente Kang *et al.*, (2008) demostraron que en patos domésticos pueden haber rearrreglos genéticos de los virus agrupados en el tiempo.

La divergencia en base al hospedero es relativamente baja. Abolnick *et al.*, (2006) reportaron que la cepa H6N2 en pollos, procede de cepas bajamente patógenas H6N8 y H9N2 presentes en avestruces e introducidos por aves silvestres; indicando que las avestruces pueden actuar como hospederos intermediarios de estas cepas transmitiéndolas ocasionalmente a otras aves domésticas. En contraste Gambaryan *et*

al., (2005) concluyeron que los virus H5N1 aislados de humanos y pollos mostraron características similares a los H9N2 aislados en codornices; sugiriendo que esta especie puede mezclar los genes virales, dando lugar al surgimiento de nuevas cepas con incremento en la probable transmisión inter especies (Pérez *et al.*, 2003).

2.7 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Se debe tener cuidado en generalizar los aspectos epidemiológicos de la IA (Hanson *et al.*, 2005). La epidemiología de la IA en aves silvestres es definida por interacciones entre el hospedero, agente casual y el medio ambiente (Stallknecht y Brown, 2007). En aves domésticas el tipo de crianza y la especie hospedera, podrían estar actuando adicionalmente.

2.7.1 Factores de riesgo para la difusión de los virus

Para un adecuado análisis de riesgo se deben identificar una serie de factores que involucra el riesgo de la introducción y difusión de los virus en poblaciones de aves (FAO, 2007e).

La difusión de los virus a poblaciones de aves domésticas depende de algunos factores como:

- Las características epidemiológicas de los virus (incubación, período clínico, resistencia) (Swayne y Halvorson. 2003).
- Las especies domésticas afectadas (aves de corral, pavos y otra especies) (Suarez, 2004).
- Los productos contaminados (huevos, carne) (Martin *et al.*, 2007).
- Las personas y objetos en contacto (zapatos, cabellos, vestimenta, equipos, materiales, etc.) (OIE, 2009).
- Las aves silvestres migratorias y las aves silvestres residentes del lugar como reservorios asintomáticos (Yee y Carpenter, 2009).

Los factores de riesgo en especies de aves silvestres para actuar como agentes dispersores de la enfermedad se basan en su comportamiento. Según Blanco, estos factores pueden ser:

- El uso de hábitat, que influye en la posibilidad de transmisión de un ave silvestre infectada a otra, por contagio directo ó a través del hábitat (hábitat acuático mayor a hábitat terrestre; agua dulce mayor a agua salobre).
- Gregarismo durante la reproducción, migración y período no reproductivo. Las especies altamente gregarias tienen una mayor probabilidad de ser infectadas,

dado que el contacto cercano entre las aves puede resultar en una transmisión más fácil de un ave a otra.

- Los grupos mixtos, las especies que fácilmente se mezclan con otras son más susceptibles a ser contagiadas con el virus.
- Concentración en agro ecosistemas (pequeñas áreas y grandes densidades), donde entran en contacto con aves domésticas.
- Migraciones y contacto con otras especies, las especies de alto riesgo tendrán la posibilidad de contraer y transmitir los VIA, si en su migración atraviesan algún área donde halla un brote de enfermedad y donde podrían infectarse; y
- Abundancia en la especie (número de individuos).

La intervención de estos factores en la presentación de brotes es variable. Por ejemplo; el contacto de aves domésticas con aves silvestres tiene relación con los brotes producidos en Minnesota en EEUU en la década de los 80; asimismo el contacto de aves silvestres con fuentes de agua de aves domésticas probablemente influyó en los brotes de Australia y Chile (Suarez, 2004); por otra parte el contacto entre granjas de pavos y de porcinos tuvo relación con re arreglos de virus H1N1 y H1N2; finalmente el mercadeo de aves vivas probablemente tuvo relación con los brotes desde 1994 en USA y los brotes desde 1997 en varios países de Asia (*op. cit.*).

También pueden intervenir una combinación de factores; como en el caso de los brotes de Asia con su expansión hacia Europa y África (Yee y Carpenter, 2009). El contacto de patos domésticos sueltos en arrozales, aledaños a humedales que interactuaron con patos silvestres, pudo ser un factor crítico en la persistencia y propagación de los VIAAP H5N1 en Tailandia (Gilbert *et al.*, 2006 y Songserm *et al.*, 2006). Por otra parte en el Sud este Asiático Martin *et al.*, (2006) identificaron que las aves acuáticas domésticas, prácticas específicas de granjeros y ambientes agro-ecológicos jugaron un rol clave en la ocurrencia, mantenimiento y difusión de la IAAP (Cuadro 04).

Finalmente Hulse-Post *et al.*, (2005); y Shortridge y Melvilla, (2006); concluyeron que los patos domésticos asiáticos determinaron un papel muy importante en la epidemiología de la IAAP por el subtipo H5N1 no sólo en la génesis del virus, sino en su propagación y mantenimiento en varios países asiáticos.

**Cuadro 04. Factores de Riesgo para la presentación
de la IAAP en Asia**

Categoría de riesgo	Datos	Tipo	Observaciones
General	Aguas superficiales Redes de vías Lugares sobre poblados Límites administrativos	Geográfico: vector Geográfico : vector Geográfico : vector Geográfico : vector	Ríos y lagos Caminos mayores El más pequeño nivel posible
Agricultura y Enfermedad	Uso de tierras Sistema familiar Sistema de caza Localizaciones de mercados Localizaciones de camales Densidad de especies de aves Uso de vacunas	Geográfico : vector Geográfico : vector Geográfico : vector Geográfico : vector Geográfico : vector Geográfico : trama	
Ambiente natural	Lluvias de invierno, temperatura, humedad, etc. Elevación Vegetación Enfermedad de Newcastle Aves silvestres	Geográfico : vector Geográfico : vector Geográfico : vector Geográfico : vector Geográfico : vector	Mapas de patrones migratorios
Población humana	Datos socioeconómicos Festivales Factores culturales	Geográfico : vector Temporal y geográfico Geográfico	Mapas de pobreza Hábitats de consumidores

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (FAO, 2004)

Nótese la intervención de varios factores de riesgo categorizados en la presentación de la enfermedad.

2.7.2 Ecología de los virus

Las investigaciones realizadas por Stallknecht y Brown, (2007) demostraron que las especies y la estructura de poblaciones son importantes en el mantenimiento de los virus, su transmisión y posiblemente los movimientos a largas distancias.

2.7.2.1 En aves silvestres y domésticas

Desde la emergencia del H5 en Asia en 1996 y el aparente incremento en la frecuencia del H7 de alta patogenicidad en Europa y América, se enfocó atención en la ecología de los VIA en aves silvestres (Fouchier *et al.*, 2004; Jones y Swayne, 2004). Esto fue resultado de la vigilancia de aves silvestres en muchos países, incluyendo Japón, Rusia y las Américas. Los estudios de mas de 30 años realizados por Krauss, en patos silvestres y 2 años en aves playeras que migran de Sudamérica en primavera

(Mayo) y de Alberta, Canadá en invierno (Agosto) confirmó y expandió nuestro entendimiento de los principios ecológicos de los VIA en aves silvestres (Ver apéndice 2.7.5.2).

Todos los subtipos virales se han encontrado en aves silvestres migratorias acuáticas de lagunas y aves costeras (Marco *et al.*, 2005; Weaver, 2005). Según Alexander, (2007a) la mayoría son del orden Anseriformes (patos, gansos y cisnes) y Charadriiformes (gaviotas, golondrinas marinas y aves de las orillas). Por otra parte Whitworth *et al.*, (2007) reportó que casi el 60% de especies silvestres tienen como hábitats los humedales y pueden infectarse con cepas altamente patógenas H5N1, produciendo alta proporción de mortalidad en la población (Convención Ramsar, 2005) (Ver Cuadro 03).

La FAO menciona que todos los aislados H5N1 provienen de aves acuáticas y silvestres, han sido altamente patogénicos en pollos. Algunas aves acuáticas migratorias portan y diseminan los VIAAP H5N1 actualmente en circulación, como los patos y gansos silvestres en África (Slemons *et al.*, 2003; Munster *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009). Asimismo según Causey y Edwards, (2008) estas aves son vectores potenciales para transmitir variantes altamente patógenos a grandes distancias de las fuentes originales de infección (OIE/FAO/IZSVe, y UE, 2007); cambiando periódicamente los subtipos virales (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009).

Las aves silvestres acuáticas también pueden portar los VIABP en forma asintomática, transmitiéndolos y causando una enfermedad leve en las aves de corral; sin embargo después de un tiempo algunos de estos virus pueden mutar y volverse altamente patógenos causando epidemias graves (Whitworth *et al.*, 2007; OIE/FAO/IZSVe y UE, 2007). Según Kaleta *et al.*, (2005) los patos (en su mayoría Mallard “*Anas platyrhynchos*”) son los más comprometidos y proveen el 65.9% de los virus aislados; asimismo Hanson *et al.*, (2000) reportó mayor prevalencia de infección en patos salvajes jóvenes que en adultos; no obstante según Linzito *et al.*, (2005) solo se conoce un único brote de epizootia en estas aves.

Diferentes subtipos de VIA en patos silvestres migratorios en la zona este de Asia se identificaron a finales de los 90 (Kida *et al.*, 2001); además ciertas especies fueron capaces de transportar los virus asintomáticamente (Martin *et al.*, 2007). En esa línea Capua y Marangon, (2006b) reportaron que los patos domésticos pueden actuar como reservorios de los virus H5N1 con o sin signos clínicos; excretándolos durante largos períodos (CENAVECE). Las características etológicas de esta especie aportaría

grandemente a actuar como mayores reservorios de virus frente a otras especies (Whitworth *et al.*, 2007).

2.7.2.2 En el medio ambiente

Actualmente no hay consenso sobre el tiempo de supervivencia de los virus en el medio ambiente. Los virus pueden sobrevivir por largos períodos, permanecer infecciosos en la tierra, agua o equipos contaminados por semanas ó meses dependiendo de la temperatura y humedad (especialmente cuando la temperatura es baja) (NABC - Kansas State University, 2009), la salinidad y la presencia de materia orgánica (Buscaglia, 2004, CFSPH/ IICAB / OIE, 2009). Algunos datos implican bajas humedades relativas (20 - 35%) producidas por calentamiento interno y temperaturas frías (5°C) como se produce en invierno a favor de la dispersión de los virus (Lowen *et al.*, 2007).

Algunos estudios demostraron que los virus H7N2 permanecieron hasta dos semanas en las heces y en jaulas hasta 32 días de 15 a 20°C, y al menos 20 días de 28 a 30°C (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009); otros estudios concluyeron que los VIABP pudieron sobrevivir de 44 a 105 días en heces. Por otra parte los VIAAP pueden sobrevivir menos tiempo en el agua; sin embargo persisten en agua dulce durante 100 días o más a temperaturas iguales o inferiores a 17°C, aproximadamente 26 a 30 días a 28°C; e indefinidamente cuando están congelados (*op. cit.*).

Los virus no resisten altas temperaturas, por tanto los brotes de la enfermedad se producen más en invierno (Buscaglia, 2004). Los ambientes mas fríos y las temperaturas de aguas superficiales, la contaminación fecal de superficies y charcos de agua, incrementaron la actividad de las aves acuáticas asociado con la congregación, preparación para la migración y la adaptación al subtipo viral antes de la detección, y pudieron haber sido responsables del retardo de la infección en otras especies de aves como pavos (Weaver, 2005).

Finalmente el análisis del agua y materia fecal en el hábitat de las aves acuáticas pueden brindar evidencia de los virus que circulan entre las poblaciones de aves silvestres, de los subtipos específicos, sus niveles de patogenicidad y de los posibles riesgos para las aves de corral y el ganado susceptible (USDA, 2007). Por otro lado se desconoce qué tan importante sería la vía respiratoria en la excreción viral para la manutención de los VIAAP H5N1, su persistencia en ambientes acuáticos y la transmisión entre especies silvestres y domésticas (Beldoménico y Uhart, 2008).

2.7.2.3 Presencia de humedales

Los humedales desempeñan una función muy importante como reservorios de los virus en la epidemiología natural de la enfermedad. Hinshaw *et al.*, (1980) concluyó que en algunos humedales poblados por una gran cantidad de patos migratorios se pudo aislar fácilmente partículas virales del agua. Por otra parte según la FAO y OIE, los virus aislados del agua de lagos donde las aves acuáticas están presentes, infectan una y otra vez a las aves acuáticas procedentes de zonas meridionales donde se reproducen (Convención sobre las especies migratorias, 2008).

Los virus individualmente difieren en su habilidad para mantenerse infectivos y su persistencia depende de la temperatura, pH y salinidad dentro de rangos que son normalmente encontrados en aguas superficiales de campo; no obstante se ha demostrado la persistencia de los VIA en agua dulce (Webster, 1978; Brown *et al.*, 2007). Por otra parte la persistencia de VIAAP es inversamente proporcional a la temperatura y salinidad del agua (Stallknecht *et al.*, 1990).

Según el USDA, 2007 y Beldoménico y Uhart, 2008; ya sea como causa o consecuencia de que las aves acuáticas sean hospederos naturales de los VIA, los humedales cumplen un rol preponderante en su eco-epidemiología, existiendo factores que influyen en su protagonismo tales como:

- La alta densidad de aves susceptibles de distintas especies que se congregan en estos sitios, asegurando una alta tasa de contacto entre aves infectadas y susceptibles.
- Las aves acuáticas (Anseriformes y Charadriiformes) que son el reservorio natural de la mayoría de las cepas de VIA.
- Los virus que persisten en agua dulce y la ruta fecal-oral vía agua contaminada que parece ser su principal forma de transmisión.
- El agrupamiento de especies diferentes que hace posible la coinfección con varias cepas y el intercambio viral entre distintos hospederos, favoreciendo de esta manera la evolución del virus y la emergencia de nuevas variantes antigénicas (cepas virales).
- El uso de estos lugares como sitios de escala por parte de aves migratorias que supone una periódica inmigración y emigración de individuos potencialmente portadores de virus.

Las aves que se crían en alojamientos abiertos y zonas ricas en lagos, contactan con patos silvestres portadores, consecuentemente los virus se difunden con cierta facilidad hasta alcanzar aves de traspatio, llegando a explotaciones comerciales de

pollos de engorde y gallinas de postura donde la difusión es muy rápida (Linzito *et al.*, 2005). Esto se debe a los sistemas de manejo que movilizan a los virus entre granjas (García, 2009); además de las prácticas agrícolas sobretodo cerca de humedales que pueden aumentar la capacidad de propagación del virus (Convención sobre las especies migratorias, 2008).

Finalmente los brotes de IA en Chile probablemente se debieron al contacto entre especies silvestres y domésticas potencialmente portadoras (Spackman *et al.*, 2007); por tanto este contacto no debe desconocerse, ya que algunos planteles de alta producción se instalaron en las cercanías de importantes humedales (Tala, 2006); sin embargo el riesgo es superior en caso del contacto cercano de aves domésticas provenientes de crianzas artesanales (traspatio), como gallinas, pavos y aves acuáticas; ello porque es muy común que patos y gansos domésticos nadan en los mismos sitios de concentración de las aves silvestres (*op. cit.*); según Alexander, (2000) los VIA se aislaron en estas especies en proporción de 15 y 2% respectivamente.

2.7.3 Huéspedes y reservorios

Las aves silvestres acuáticas migratorias y costeras, son **huéspedes naturales** de los VIA y no desarrollan mayormente enfermedad (Wetlands International Globalsite, 2007). Estas pueden transmitir los virus a otras especies de diferentes taxa (otras aves, cerdos, equinos, félidos, visón, mamíferos marinos y humanos) (Beldoménico y Uhart, 2008). Los cerdos, pollos y codornices, tienen receptores para los VIA y virus de Influenza de mamíferos y se consideran **huéspedes intermediarios** para su transmisión a aves silvestres y otros mamíferos incluyendo humanos (Webster *et al.*, 2007). Las gallináceas también pueden actuar como hospederos intermediarios y transmitirlos a otras aves (*op. cit.*).

Las poblaciones de aves silvestres migratorias y aves acuáticas salvajes incluyendo patos, gansos, cisnes, aves de la costa y el mar; constituyen los mayores **reservorios naturales** de los virus (Olsen *et al.*, 2006; Stallknecht y Brown, 2007); sin embargo en su mayoría son reservorios de los VIABP (Whitworth *et al.*, 2007; Herrero - Uribe, 2008). Los VIAAP generalmente son detectados en brotes de la enfermedad en aves de corral, incluyendo pollos, pavos, codornices y faisanes (OIE, 2009) pudiendo causar una leve enfermedad de menor importancia cuando infectan a otros patos, gansos y aves acuáticas (Dir. Nac. San. Anim. - Argent, 2003).

Los reservorios naturales expulsan grandes cantidades de virus al ambiente; y estas son mayores si existe un compromiso clínico (Morgan y Kelly, 1990; Brown *et al.*,

2006). Muchos brotes de la enfermedad en aves comerciales se han asociado al contacto con estos reservorios (OPS, 2006); produciéndose desde un cuadro medianamente patógeno hasta una enfermedad rápidamente mortal (NABC-Kansas State University, 2009); esto favorece el mantenimiento y emergencia de nuevas cepas potencialmente patógenas por mutación o recombinación genética, tal como lo reportó en Europa Capua y Marangon, (2006a).

El pato es una especie importante como reservorio natural de los VIA. Kim *et al.*, 2009; demostraron que varias especies de patos son naturalmente resistentes a la cepa H5N1 asiática altamente patógena, y pueden excretar los virus del tracto respiratorio e intestinal asintóticamente; además Chen *et al.* (2004) determinaron que estos pueden ser portadores asintomáticos de los VIAAP H5N1 para pollos y mamíferos; no obstante falta resolver si estos virus son mantenidos en la población de patos silvestres del mundo. Existe evidencia que las especies de patos silvestres pueden dispersarlos, pero falta demostrar si estos los mantienen y transfieren los virus de una generación a la siguiente (Kim *et al.*, 2009).

Los reservorios transmiten el virus a través de sus fuentes directas que pueden ser heces, secreciones respiratorias y tejidos de aves infectadas (FAO, 2006c); y las fuentes indirectas que pueden ser fómites, agua, alimento, personas y hasta objetos que han estado en contacto con los virus. Finalmente los VIAAP pueden ser viables durante mucho tiempo en algunas fuentes indirectas (OIE, 2008).

2.7.4 Susceptibilidad de especies

La mayoría de especies de aves domésticas y silvestres son susceptibles a la infección por VIA tipo A. En aves silvestres, la infección se produce primariamente en patos, gansos, y otras aves silvestres acuáticas; otras especies susceptibles son las codornices, faisanes y pintadas (Suarez, 2004; Brown *et al.*, 2006). En aves domésticas los pollos y pavos son primariamente susceptibles (Tollis y Triani, 2002; Espinal, 2007). Por otra parte según Brown *et al.*, (2007) los patos de bosque representan una especie indicadora en la sensibilidad a la infección.

La especificidad de los VIA por el hospedero, está determinada por la unión preferencial de la H al receptor celular presente, compuesto de ácido siálico (AS) en la porción distal de los oligosacáridos (Gal), y glicolípidos formando el glicocáliz celular. Para Gambaryan *et al.*, (2005) los aislados virales de distintas especies aviares difieren por su reconocimiento al receptor oligosacárido de la parte interna. Las diferencias en la forma de unión entre el AS con las dos moléculas continuas determinan dos tipos de

cadenas; AS- α -2-3-Gal- β -1-3-N-acetil-glucosamina (AS α 2, 3 Gal) en aves, y AS- α -2-6-Gal- β -1-4-N-acetil-glucosamina (AS α 2, 6 Gal) en humanos (Swayne y Halvorson. 2003).

Un número de hospederos incluyendo porcinos, pollos y codornices tienen receptores para los virus de Influenza de otros mamíferos incluyendo humanos (Webster *et al.*, 2007a). Hay evidencia de la presencia de (AS α 2,3 Gal) y (AS α 2,6 Gal) en pulmones humanos lo cual explicaría la directa transferencia de los virus de influenza a humanos sugiriendo que los porcinos no son un hospedero intermediario requerido, aunque ellos podrían servir para facilitar la adaptación y continuar la transmisibilidad en humanos (Shinya *et al.*, 2006; Van Riel *et al.*, 2006).

Ambas formas de unión se encuentran en porcinos y codornices, consecuentemente estas especies pueden actuar como mezcladores de cepas de humanos y aves, posibilitando la transmisión entre especies y el surgimiento de virus pandémicos (Pérez *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2007). Por su parte, Tollis y Triani, (2002); concluyeron que influyen tres características primarias en la ocurrencia de la enfermedad en las especies susceptibles:

- a).- la probabilidad de exposición al agente causal;
- b).- la virulencia del virus; y
- c).- la habilidad del hospedero a contrarrestar el mecanismo patogénico.

Las barreras de las especies a los virus pueden ser categorizadas dentro de las interacciones virus - hospedero, hospedero - hospedero e individuales, ó dentro y entre especies, principalmente porque afecta la interacción hospedero - virus (Kuiken *et al.*, 2006); sin embargo el desarrollo de la capacidad para la transmisión sostenida en una nueva especie hospedera, representa un mayor desafío adaptativo debido a que el número de mutaciones requerido es a menudo grande (*op. cit.*).

Según la OIE, la infección viral también se reporta en mamíferos marinos como focas, ballenas y mamíferos terrestres como cerdos, caballos, visones, tigres, leopardos, gatos, humanos y recientemente en perros; además algunas cepas virales pueden causar enfermedad caballos, visones, gatos, perros, hurones, vuelve piedras, palma civetas, mamíferos marinos y otras especies.

2.7.5 Rol de las aves silvestres en la propagación de los VIA

El papel de las aves silvestres en la dispersión de los VIA es importante. Halvorson *et al.*, (1985) reportaron que los VIABP pueden persistir en ambientes

subtropicales y pueden ser perpetuados todo el año en especies silvestres de Eurasia y de zonas Afro tropicales. Por otra parte según Arzey, (2004) las aves silvestres son reservorios del virus en Australia, sin embargo su rol en la transmisión de la enfermedad es cuestionable. Adicionalmente Fumin *et al.*, (2006) encontraron que en China los VIAAP H5N1 existen en aves migratorias y pueden diseminarse a otras regiones mediante sus migraciones.

El rol en la presentación de brotes de IA es variable. La rápida propagación de los VIAAP H5N1 hacia el este Asiático y Europa en el 2005 y 2006, con aparición de casos en aves silvestres no asociados a brotes en aves domésticas, sugirió que algunas aves migratorias podrían ser parcialmente responsables de este movimiento, al menos en tramos cortos (Normile, 2006). En los episodios del 2005, existió una correlación temporo-espacial entre la propagación de casos hacia occidente y las rutas migratorias de muchos Anatidae de Asia (Gilbert *et al.*, 2006b); no obstante una proporción de estos casos fuera del Asia se originaron por el comercio no regulado de aves de corral y fallas en la bioseguridad de las granjas avícolas tal como menciona DEFRA, (2007).

La cepa H5N1 ha causado muerte de aves en más de 40 especies (Blanco, 2009). Las especies más comprometidas son las asociadas a sistemas acuáticos (inferiores o costeros), y muchas son migratorias que pudieron actuar como agentes dispersores de la enfermedad (Beldoménico y Uhart, 2008). Aquí se considera a aves acuáticas no passeriformes que dependen ecológicamente de los humedales para cubrir sus requerimientos básicos (Blanco, 2009).

2.7.5.1 Migración de aves silvestres

Es un fenómeno instintivo, producido por mecanismos neurofisiológicos adquiridos por un largo proceso de selección natural que se transmite hereditariamente (Bort y Bort, 1998); y es influenciado por cambios climáticos, para aprovechar la abundancia estacional de alimento en la época de verano para anidar (García *et al.*, 2006). Es una estrategia común en aves que ocupan hábitats estacionales, y consta de movimientos locales de corto alcance hasta migraciones intercontinentales (Del Hoyo, 1996). Consecuentemente las aves migratorias pueden transportar patógenos, siempre que éstos no afecten de manera significativa su estado de salud (Hubalek, 2004).

Las migraciones corresponden a desplazamientos periódicos, regulares y predecibles en el tiempo y espacio de una población completa o una parte, retornando a su lugar original después de un tiempo (Bort y Bort, 1998; Boere *et al.*, 2006). La mayoría de migraciones se producen en **sentido latitudinal** (norte - sur) y pueden ser de

largo, mediando o corto alcance, como lo hacen las aves playeras, zarapitos, algunas gaviotas, gaviotines, golondrinas bermejas entre otras; en **sentido altitudinal** como lo hacen las dormilonas y la tórtola cordillerana entre otras; y en **sentido longitudinal** como las especies que migran de zonas interiores a las costas en el mismo continente (Tala, 2006).

Las migraciones pueden jugar un rol importante en el mantenimiento y dispersión de los virus bajamente patógenos y otros virus como el H5N1 (Whitworth *et al.*, 2007); entre los continentes de Asia, Europa y África (Muñoz *et al.*, 2006); y potencialmente podrían dispersarlos a grandes humedales llevándolos por migración desde países endémicos hasta Norteamérica y Sudamérica (FAO, 2007c). No obstante Bunn, (2004); reportó previamente que el rol de las aves silvestres en la epidemiología de la enfermedad difiere en Australia, parte de Europa y Norte América; probablemente por la forma de confinamiento y las diferentes rutas de migración.

La migración latitudinal de las anátidas influye en la epidemiología de la IA. Muchas bandadas se reúnen en lagos y charcas, para prepararse y emanciparse; presentando cambios fisiológicos a nivel digestivo y en tejido muscular para soportar largos viajes (Bort y Bort, 1998); asimismo los individuos infectados liberan partículas virales constantemente transmitiéndolos a los jóvenes que aún no están contagiados, convirtiéndolos en portadores del virus (Whitworth *et al.*, 2007).

Las aves migratorias rara vez vuelan el recorrido completo de su ruta entre áreas de nidificación y de invernada, parando frecuentemente para recuperar energías (por lo general en humedales) y pasan más tiempo comiendo y preparándose para migrar que volando (Beldoménico y Uhart, 2008). Esto sucede mayormente con los pájaros; sin embargo muchos Anseriformes y Charadriiformes realizan migraciones regulares de larga distancia, y podrían distribuir los virus de baja patogenicidad entre países y continentes (Del Hoyo *et al.*, 1996); asimismo dependiendo de la especie, cierto segmento de una población puede permanecer en un área acogedora todo el año si las condiciones lo permiten (Whitworth *et al.*, 2007).

Muchas especies que van a escala global favorable o sitios de hibernación, forman altas densidades locales. Estos sitios pueden ser importantes para la transmisión de VIA entre aves silvestres y en cautiverio, y entre las diferentes especies (Fouchier *et al.*, 2007). Por otra parte la mayoría de las especies de gaviotas se reproducen en grandes colonias, donde las aves adultas y jóvenes se encuentran conglomeradas en poco espacio, favoreciendo la dispersión de los virus (Munster *et al.*, 2007). Éste

aspecto ecológico es importante, puesto que cualquier brote podría iniciarse y extenderse rápidamente en los grupos de aves que se congregan en grandes números durante la muda, migración, reproducción o invernada (*op. cit.*).

Las aves que nidifican en una misma región geográfica por lo general siguen rutas migratorias similares. Estas migraciones conectan a varias poblaciones de aves en tiempo y espacio, ya sea en áreas de nidificación comunes, durante la migración, o en áreas compartidas donde pasan el invierno (Olsen *et al.*, 2006). Como resultado, estas congregaciones permiten que las aves infectadas transmitan sus patógenos a otras poblaciones y subsecuentemente pueden llevar el virus a una nueva región (*op. cit.*). No obstante Van Gils *et al.*, (2007) mostraron evidencias de que la infección natural con VIABP estaría asociada a un desempeño migratorio disminuido en cisnes de Bewick (*Cygnus columbianus bewickii*).

Los movimientos migratorios de aves entre Alaska y las áreas de Siberia del este, representan una situación única en donde los principales sistemas de rutas de migración cruzan los límites continentales (Figura 03). Además en América del Norte, la ruta de migración del Pacífico se extiende desde el Ártico canadiense, Alaska y Siberia Oriental, a través de las regiones costeras y del oeste de Canadá, los Estados Unidos y México, y prosigue hacia América Central y del Sur (USDA, 2007).

La superposición en los extremos del norte de estas rutas de migración, y en Hawai y Oceanía, establece un camino para la transmisión potencial de la enfermedad a través de los continentes y, para la mezcla, el realineamiento y el intercambio de material genético entre las cepas desde Eurasia y América del Norte (USDA, 2007). Dentro de los corredores migratorios en la región Neotropical existen cuatro grandes corredores migratorios: Pacífico, Atlántico, Central y del Mississippi (Figura 03).

Los patrones de migración indican que en el norte del continente, las aves silvestres muestran un pico de aislamiento viral mayor entre Setiembre a Octubre, y las aves marinas entre los meses de Marzo a Mayo. La frecuencia de aislamientos de los VIA disminuye en los meses de invierno en el extremo norte (Noviembre a Abril) (Webster *et al.*, 2007); para estos meses las mayores poblaciones están en el sur del continente y probablemente han dispersado los VIA a las poblaciones de aves silvestres no migratorias residentes de los humedales de la costa en la ruta del Pacífico en Sudamérica y estos pueden persistir durante el resto del año.

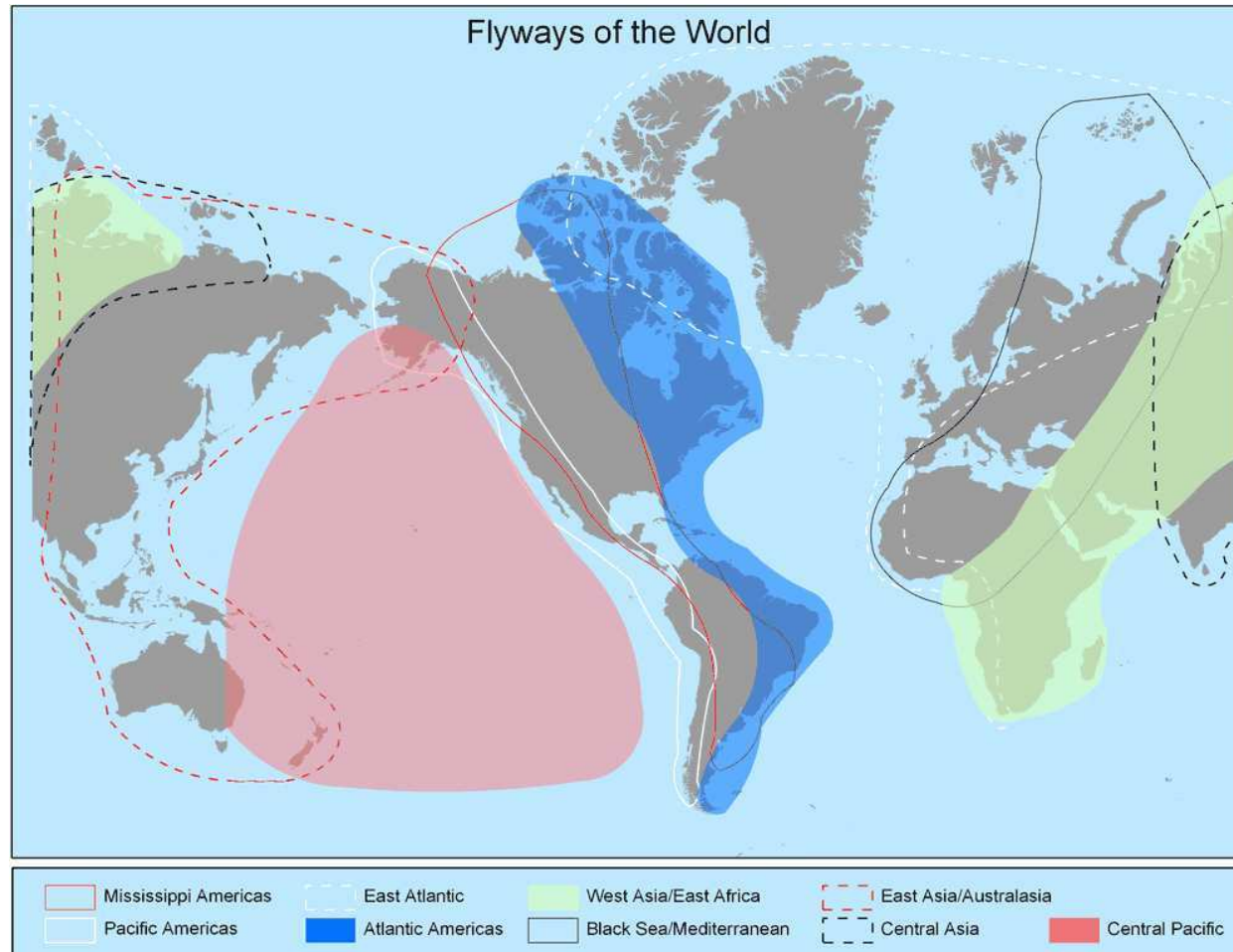
Las migraciones longitudinales son más importantes que las intercontinentales en la difusión global de los VIA tal lo como lo menciona García, (2009); sin embargo la diseminación del VIA H5N1 de Asia a Africa y Europa indicaría que esto es valido solo para el continente americano. Los inviernos en la costa central del país no son tan variables en cuanto a su temperatura y humedad como lo que ocurre en el norte del continente, por este motivo la migración de las poblaciones silvestres provenientes de estos lugares se mantiene durante todo el año, aunque entre los meses de Octubre y Abril es mayor (INRENA; Franke, comunicación personal).

Las aves silvestres migran en su mayoría desde el norte hacia el sur del continente americano, siendo menos frecuente desde el sur hacia el norte; debido al acercamiento del norte a las zonas árticas en invierno con una disminución más intensa de las temperaturas (Tala, 2006). Las aves migratorias australes se reproducen en el sur y en época no reproductiva se desplazan hacia el norte, llegando a zonas tropicales (Ecuador o Colombia) o subtropicales (Perú o Bolivia); algunas incluso cruzan hacia el hemisferio norte (*op. cit.*).

En el mundo, las especies migratorias boreales (aproximadamente 420) son más numerosas que las australes (aproximadamente 220 a 240) (Chesser, 1994 y Stotz *et al.*, 1996). Las aves acuáticas del Neotrópico se clasifican en 8 órdenes y 25 familias, totalizando 298 especies, de las cuales 46% son migratorias (Blanco, 2009). Por otra el mismo autor reportó que en América del Sur existen alrededor de 100 especies de aves acuáticas migratorias, las que pueden ser clasificadas en migratorias neárticas, neotropicales y patagónicas.

Las aves migratorias neárticas se reproducen en la tundra de América del Norte y migran al Hemisferio Sur durante la época reproductiva; llegan al sur de Sudamérica en la primavera temprana (Setiembre) y abandonan la región a fines del verano (Abril). Entre las aves migratorias se mencionan a los Chorlos (Charadiidae), Playeros (Scolopacidae), Gaviotines (Sternidae), Gaviotas pardas (Stercorariidae), Pato media luna (*Anas discors*) y Chorlito canela (Cuadro 05)

Figura 03. Rutas migratorias de aves silvestres en el mundo



Monke y Corn, 2007

Cuadro 05. Especies migratorias identificadas que viajan entre Norte y Sudamérica según orden y familia

Orden	Familia	Nombre común	Nº especies boreales	Nº especies australes
Procellariiformes	Procellariidae *	Petrelas y fardelas	1	10
	Oceanitidae	Golondrinas de mar	-	1
Anseriformes	Anatidae	Patos	1	-
Falconiformes	Pandionidae	Aguila pescadora	1	-
	Accipitridae	Aguiluchos	1	-
	Falconidae	Halcones	1 **	-
Charadriiformes	Charadriidae	Chorlos	3	-
	Scolopacidae	Zarapitos y playeros	27	-
	Laridae	Gaviotas y gaviotines	12	2
Apodiformes	Apodidae	Vencejos	1	-
Passeriformes	Tyrannidae	Cazamoscas	1	-
	Hirundinidae	Golondrinas	4	-
	Muscicapidae	Zorales	1	-
	Vireonidae	Verderones	1	-
	Emberizidae	Charlatán, estrellitas	4	-
Total			59***	13

* Fundamentalmente son aves migratorias silvestres

** Sólo las subespecies *Falco peregrinus tundrius* y *anatum* son migratorias

*** 18 especies son sólo accidentales u ocasionales.

Tala, 2006.

NOTA: Cabe señalar que según el autor las especies silvestres consideradas en el cuadro migran hasta el sur de Sudamérica en Chile, lo que falta a considerar que una cantidad adicional de especies migratorias puedan llegar al Perú (ubicado al norte).

2.7.5.2 Prevalencia de la infección por VIA en aves silvestres

La prevalencia es variable en aves silvestres. La prevalencia de la infección por subtipos virales en aves acuáticas migratorias varían de acuerdo a la edad, estación y especie (Weaver, 2005); asimismo la distribución en las especies hospederas varia dependiendo del año y la estación (Tollis y Triani, 2002). Los VIABP se mantienen principalmente en las comunidades de aves acuáticas, las que en general sufren la infección de manera asintomática (Beldoménico y Uhart, 2008).

Los estudios de vigilancia dependiente de la especie, el tiempo y espacio determinaron la distribución de los subtipos (Stallknecht y Brown, 2007; Fouchier *et al.*, 2007); no obstante los aislamientos más frecuentes corresponden principalmente a aves

de los géneros *Anas*, *Anser*, *Cygnus*, *Larus*, y *Uria*, asimismo el género con prevalencias más altas es *Anas* (Cuadro 06) (Olsen *et al.*, 2006). Los estudios ecológicos confirmaron que las especies acuáticas en el mundo son los principales reservorios de los virus, con notable diferencia entre Europa y América por ausencia de reservorios significantes de VIA en aves playeras europeas (*op. cit.*).

Las mayores prevalencias de los VIABP son observadas principalmente en aves que migran largas distancias y en aquellas que se alimentan en la superficie del agua (Garamszegi y Møller, 2007). En esa línea Olsen *et al.*, (2006) demostraron que las prevalencias son mucho más elevadas en patos de superficie (aproximadamente 10%) que en patos zambullidores y el resto de las aves acuáticas (<2%). Esta variación entre gremios de patos puede deberse a la diferencia en comportamiento alimenticio, ya que los patos zambullidores se alimentan a más profundidad y por lo general en hábitats marinos tal como lo menciona Del Hoyo *et al.*, (1996).

Cuadro 06. Prevalencia de los VIA tipo A en aves silvestres

Grupo	Total de muestras	Muestras positivas	Prevalencia (%)
Patos (principalmente <i>Anas</i> spp.)	34503	3275	9.5
Cisnes (<i>Cygnus</i> spp.)	5009	94	1.9
Gansos (<i>Anser</i> spp. y <i>Branta</i> spp.)	4806	47	1.0
Gaviotas (<i>Larus</i> spp.)	14505	199	1.4
Gaviotines (<i>Sterna</i> spp.)	2521	24	0.9
Playeros y chorlos (Familias Scolopacidae y Charadriidae)	2637	21	0.8
Galleretas (Gruiformes: <i>Fulica</i> spp.)	1962	27	1.4
Cormoranes (Orden Pelecaniformes)	4500	18	0.4
Petrelas (Orden Procelariiformes)	1416	4	0.3

Adaptada de Olsen *et al.*, 2006 por Beldoménico y Uhart, 2008.

Las aves playeras (familias Charadriidae y Scolopacidae) no aparentan ser un reservorio significativo en Eurasia (Munster *et al.*, 2007) pero parecen ser la fuente principal de VIA en Norte América, y tienen la mayor variedad de subtipos (Krauss *et al.*, 2004). Por otra parte en América, los subtipos capaces de volverse altamente patogénicos (H5 y H7) se hallan con más frecuencia en playeras (Krauss *et al.*, 2007). Finalmente los VIABP H5N1 se han aislado con moderada frecuencia en patos de Norte América (USDA, 2007).

La diversidad en los subtipos virales no está bien entendida, pero las diferencias de prevalencias que existen entre especies de Charadriiformes y patos sí. El rol de las aves costeras debe ser considerado separadamente de las aves migratorias acuáticas (USDA, 2006). Hasta el 2004, nueve subtipos de virus ocurrieron más en aves playeras que en patos, incluyendo los H5, H7, H9 y H13 (Krauss *et al.*, 2004). Estos datos en la diversidad, son limitados en importancia comparados con la mayoría de aislamientos recuperados de una especie (*Ruddy turnstone*) (Fouchier *et al.*, 2007). Los subtipos H13 y H16 son principalmente hallados en gaviotas. Esto sugiere nichos especie-específicos para algunos de los VIA (Munster *et al.*, 2007).

La alta prevalencia de los virus en aves costeras ha ocurrido en Mayo y Septiembre, el cual coincide con los picos de migración en EEUU (Kawaoka *et al.*, 1988). Los virus aislados en patos son representados por los subtipos H3, H4, H6 y H11 (Stallknecht *et al.*, 1990a; Kraus *et al.*, 2004); los H5, H7 y H9 son reportados en bajas prevalencias (Stallknecht y Shane, 1988; Krauss *et al.*, 2004); pero estos pueden ser más comunes en localizaciones específicas y tiempos transmitiéndose en áreas de migración, y aunque la prevalencia es baja, estos virus circulan durante la estación de invierno (Munster *et al.*, 2005). Finalmente el H8 es extremadamente raro en patos reportándose menos de 10 aislamientos en los últimos 20 años en Norte América (Stallknecht *et al.*, 1990a; Krauss *et al.*, 2004; Hanson *et al.*, 2005).

Cabe señalar que un virus de baja patogenicidad H7N3 se aisló de una Cerceta canela “Cinnamon Teal” (*Anas cyanoptera*) (A/Cinnamon Teal/Bolivia/4537/01) durante un monitoreo de aves acuáticas en Bolivia en el 2001 (Spackman *et al.*, 2006). Los genes N y M fueron similares a los aislados de aves silvestres de Norteamérica, la NS fue más relacionada a un virus equino y los genes restantes fueron relacionados a aislados de un brote de H7N3 altamente patogénico en aves comerciales en Chile en el 2002. Sin embargo los estudios del sitio de partición de H y los de patogénesis en pollos fueron consistentes con virus bajamente patogénicos y la dosis infectiva fue 10⁵ veces más alta para pollos que para pavos (*op. cit.*).

a) Patrón temporal

Los estudios de patrones temporales de los VIA en aves silvestres no han sido desarrollados profundamente en Sudamérica. La vigilancia epidemiológica extensiva desarrollada en patos de América del Norte ha demostrado que las mayores prevalencias de los VIABP se observan principalmente en aves juveniles (probablemente por inexperiencia inmunológica) con un pico a principios de otoño (setiembre) antes de la migración hacia el sur (Beldoménico y Uhart, 2008).

La prevalencia cae de 60% en patos muestreados de sitios pantanosos cerca a las áreas canadienses de crianza en el temprano otoño, a 0.4 - 2% en los campos en el sur de USA y 0.25% en patos que retornan a los campos de crianza en primavera (Krauss *et al.*, 2004). Patrones similares fueron detectados en patos de Europa, pero allí las prevalencias en primavera no se presentan tan bajas (más del 6.5%) y en más del 8% en patos de Siberia antes de la migración (Okazaki *et al.*, 2000).

La estacionalidad de las infecciones en aves playeras migratorias de Norteamérica (marzo a mayo) parece ser opuesta a las observadas en patos (setiembre a diciembre) con mayores prevalencias (aproximadamente 14%) durante la primavera boreal (cuando las migratorias llegan a reproducirse) (Webster *et al.*, 2007a). No obstante, estudios genéticos realizados por Widjaja *et al.*, 2004 y Spackman *et al.*, 2005 no encontraron grandes diferencias entre los VIA de playeras y patos, sugiriendo que los ‘pooles’ génicos de ambos grupos no estarían separados.

Todos estos hallazgos llevaron a plantear la hipótesis que distintas familias de aves acuáticas estarían involucradas en la perpetuación de los VIABP y que las aves playeras podrían estar llevando los virus hacia el norte y sur, cuando migran a las áreas de reproducción que comparten con los patos en la primavera boreal (Fouchier *et al.*, 2007).

Las prevalencias a través del año alcanza la posibilidad de que los VIA puedan ser perpetuados solamente en patos. Esto contrasta con la temprana hipótesis, de que las especies hospedadoras adicionales o la preservación de los virus en lagos congelados sobre el invierno jugarían un rol en la perpetuación de VIA (Webster *et al.*, 1992); esto fue confirmado por Motou, (2007) quien encontró que la concentración de partículas virales en el agua que se congelan en invierno, permanecen íntegras hasta el deshielo y la nueva temporada de preparación de las aves, lo que puede conllevar al contagio de las nuevas bandadas con virus de la temporada anterior.

Finalmente se ha evidenciado un patrón bianual en los subtipos dominantes en patos (H3, H4 y H6) en el que los picos de prevalencia en aves playeras son seguidos por picos en patos (Krauss *et al.*, 2004). Asimismo la distribución de subtipos virales puede variar en condiciones de campo; por ejemplo en USA la incidencia de la infección típicamente disminuye en los meses de invierno, pero los virus a menudo pueden ser aislados todo el año. En Europa, sin embargo esta asincronía en la prevalencia entre playeras y patos no se observa, y las playeras presentan baja

prevalencia a lo largo de todo el año, por lo que no parecen ser importantes reservorios en ese continente (Olsen *et al.*, 2006; Munster *et al.*, 2007).

b) Patrón espacial

Existen dos diferentes linajes de VIA bien delimitados y separados geográficamente, uno de Eurasia y otro Americano (Olsen *et al.*, 2006). Esto evidencia una separación ecológica y geográfica de largo plazo (*op. cit.*). Sin embargo, la avifauna de América del Norte y de Eurasia no está completamente separada (Widjaja *et al.*, 2004; Spackman *et al.*, 2005). Muchas especies de aves zancudas del Hemisferio Norte viajan largas distancias (Van de Kam *et al.*, 2004) por lo tanto pueden distribuir los virus en todo el mundo (Fouchier *et al.*, 2007).

Algunos patos y aves playeras unen a Norte América y Eurasia durante su migración (Del Hoyo *et al.*, 1996); esto sugiere que el aislamiento entre los linajes no sería completo, lo que es respaldado por el hallazgo de virus conteniendo una mezcla de genes de ambos linajes (Makarova *et al.*, 1999; Wallensten *et al.*, 2005), o el hallazgo de virus de linajes americanos en África (Abolnik, 2007). No obstante, la vigilancia epidemiológica intensiva actual sugiere que el riesgo de intercambio intercontinental de VIA sería muy bajo (Krauss *et al.*, 2007; Winker *et al.*, 2007).

En algunas zonas de EEUU se ha reportado la dispersión de los VIA y su asociación con brotes de IABP en aves comerciales (Senne y Suarez, 2006); asimismo los VIAAP recuperados de los tres brotes más importantes en América (Canadá, EEUU y Chile), tuvieron características moleculares y fenotípicas únicas que los separan de los VIAAP conocidos relacionados con los brotes de Europa y Asia (*op. cit.*).

Un estudio virológico reciente realizado por Pereda *et al.*, 2008; sugiere que existe un linaje viral único para Sudamérica, que probablemente evolucionó independientemente, con mínimo intercambio genético con VIA de otras latitudes. No obstante más allá de los patrones de migración de las aves silvestres, en el actual mundo globalizado el mayor riesgo de traslado de VIA puede ser a través del comercio y tráfico internacional de aves, subproductos, o agentes expuestos a estos (Karesh *et al.*, 2007).

2.7.5.3 Distribución de poblaciones de aves silvestres en los humedales de la costa central del Perú

Existen pocos estudios actualizados de poblaciones de aves silvestres migratorias en los humedales de la costa central del país; no obstante el INRENA reportó censos poblacionales aproximados de aves silvestres entre 1993 y el 2001; por

otra parte Acuy y Pulido en el (2007) reportaron estudios de censos de aves silvestres en la costa peruana realizados por el Grupo de Aves del Perú. La procedencia de las especies de aves residentes de los humedales en la costa central se describen en el cuadro 07; por otra parte la migración de aves silvestres se produce todo el año no obstante en los meses de invierno disminuye.

Cuadro 07. Origen de las aves silvestres de los humedales de la costa central

Origen de Migración	Número de Especies
Norteamérica	51
Sudamérica	06
Andes	21
Locales	45
Residentes	52

Instituto de Recursos Naturales (INRENA)

- Aves silvestres residentes en humedales de la costa central

Las especies de aves migratorias que viajan entre Norteamérica y Sudamérica, que llegan a toda la costa central del país en determinadas épocas del año suman aproximadamente 70, de un total aproximado de 150 especies de aves silvestres residentes.

Dentro de la fauna silvestre en los humedales de Puerto Viejo, existen 109 especies registradas agrupadas en 38 familias, de las cuales 63 especies son residentes (reproducción en dichos humedales o ambientes cercanos) y 46 especies son migratorias de la zona alto andina, del norte y sur de América; mayormente entre los meses de Noviembre a Abril (aunque están presentes todo el año). El total de las especies representa el 35% de las especies de aves silvestres registradas para el departamento de Lima y el 6% de aves silvestres registradas para el Perú (INRENA).

La avifauna registrada para los humedales de Puerto Viejo, hasta el 2004 se describe en el Cuadro 08.

Cuadro 08. Especies de aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo

FAMILIA NOMBRE CIENTIFICO	MIGRATORIO RESIDENTE	NOMBRE COMÚN	NOMBRE INGLES
PODICIPEDIDAE (ZAMBULLIDORES) <i>podiceps major</i> <i>rollandia rolland</i> <i>polidymbus podiceps</i>	 R.r R.r R.r	 Zambullidor Grande Zambullidor Pimpollo Zambullidor Pico Grueso	 GREAT GREBE WHITE-TUFTED GREBE PIED-NILLED GREBE
PHALACROCORACIDAE (CORMORANES) <i>phalacrocorax olivaceus</i>	R.l	Cushuri	NETROPIC CORMORANT
SULIDAE (PIQUEROS) <i>Sula variegata*</i>	R.l	Piquero Común	PERUVIAN BOOBY
PELECANIDAE (PELICANOS) <i>Pelacanus thagus</i>	R.l	Pelicano Peruano	PERUVIAN PELICAN
PHOENICOPTERIDAE (FLAMENCOS) <i>Phoenicopterus chilensis</i>	M.a	Parihuana	CHILEAN FLAMINGO
ARDEIDAE(GARZAS) <i>Ardea alba</i> <i>Egretta thula</i> <i>Egretta caerulea</i> <i>Egretta tricolor *</i> <i>Ardea cocoi</i> <i>Bubulcus ibits</i> <i>Ixobrychus exilis</i> <i>Ncticora ncticorax</i> <i>Butorides striatus</i>	 M.a M.a R.r M.n M.a R.l R.r R.r R.r	 Garza Blanca Grande Garza Blanca Chica Garza Azul Garza Pechiblanca Garza Cenicienta Garza Bueyera Garza Leonada Garza Huaco Garza Tamanquita	 GREAT EGRET SNOWY EGRET LITTLE BLUE HERON TRICLORED HERON COCOI HERON CATTLE EGRET LEAST BITTERN NIGHT HERON STRIATRED HERON
THRESKIORNITHIDAE (IBIS) <i>Plegadis ridgwayi</i>	M.a	Yanavico	PUNA IVIS
ANATIDAE (PATOS) <i>Anas bahamensis</i> <i>Anas cyanoptera</i> <i>Anas versicolor</i>	 R.r R.r M.a	 Pato Gargantillo Pato Colorado Pato Puna	 WHITE-CHEEKED PINTALL CINNAMON TEAL PUNA TEAL

<i>Anas discors</i> *	M.a	Pato Medialuna	BLUE-EWINGED TEAL
<i>Anas georgica</i> *	M.a	Pato Jerga	YELLOW-BILLED PINTAIL
<i>Anas flavirostris</i> *	M.a	Pato Sutro	SPECKLED TEAL
<i>Oxyura ferruginea</i>	R.r	Pato Rana	ANDEAN DUCK
CATHARTIDAE (GALLINAZOS)			
<i>Cathartes aura</i>	R.l	Gallinazo Cabeza Roja	TURKEY VULTURE
PANDIONIDAE (AGUILAS)			
<i>Pandion Haliaetus</i>	M.n	Águila Pescadora	OSPREY
ACCIPITRIDAE (AGUILUCHOS)			
<i>Buteo polyosoma</i> *	M.a	Aguilucho Común	RED-BACKED HAWK
<i>Parabuteo unicinctus</i> *	R.l	Gavilán Acanelado	HARRIS HAWK
<i>Circus cinereus</i>	R.l	Gavilán de Campo	CINEREOUS HARRIER
<i>Geranoaetus melanoleucus</i> *	R.l	Aguilucho Grande	BLACK-CHESTED BUZZARD-EAGLE
FALCONIDAE (HALCONES)			
<i>Falco peregrinus</i>	M.n	Halcón Peregrino	PEREGRINE FALCON
<i>Falco sparverius</i>	R.l	Cernicalo Americano	AMERICAN KESTREL
RALLIDAE (POLLAS DE AGUA)			
<i>Gallinula chloropus</i>	R.r	Polla de Agua	COMMON GALLINULE
<i>Fulica ardesiaca</i>	R.r	Gallareta	ANDEAN COOT
<i>Rallus sanguinolentus</i>	R.r	Gallineta Común	PLUMBEOUS RAIL
<i>Porphyryla martinica</i> *	M.a	Polla sultana	PURPLE GALLINULE
PHALAROPODIDAE (FALAROPOS)			
<i>Phalaropus tricolor</i>	M.n	Falaropo tricolor	WILSON'S PHALAROPE
<i>Phalaropus fulicaria</i> *	M.n	Falaropo Pico grueso	RED PHALAROPE
HAEMATOPODIDAE (OSTREROS)			
<i>Haematopus palliatus</i>	R.l	Ostrero Común	AMERICAN OYSTERCATCHER
<i>Haematopus ater</i> *	R.l	Ostrero Negro	BLACKISH OYSTERCATCHER
BURHINIDAE (HUEREQUEQUES)			
<i>Burhinus superciliaris</i>	R.s	Güerequeque	PERUVIAN THICK-KNEE

RECURVIROSTRIDAE (AVOCETAS) <i>Himantopus mexicanus</i> <i>Vanellus resplendens*</i>	M.a M.a	Cigüeñuela Perrito Like Like	BLACK.NECKED STILT ADEAN LAPWING
CHARADRIDAE (CHORLOS) <i>Charadrius vociferus</i> <i>Charadrius semipalmatus</i> <i>Charadrius Alexandrinus</i> <i>Pluvialis squatarola*</i>	R.r M.n R.r M.n	Chorlo Doble Collar Chorlo Semipalmado Chorlo Nevado Chorlo Ártico	KILLDEER SEMIPALMATED PLOVER SNOWY PLOVER BLACK-BELLIED PLOVER
SCOLOPACIDAE (PLAYEROS) <i>Tringa flavipes</i> <i>Tringa melanoleuca</i> <i>Actitis macularia</i> <i>Calidris alba</i> <i>Calidris Pusilla</i> <i>Calidris melanotos</i> <i>Calidris himatopus*</i> <i>Calidris mauri</i> <i>Calidris bairdii*</i> <i>Numenius phaeopus</i> <i>Arenaria interpres</i> <i>Calidris minutilla</i>	M.n M.n M.n M.n M.n M.n M.n M.n M.n M.n M.n	Patas Amarillas Menor Patas Amarillas Mayor Playero Manchado Playero Blanco Playero Semipalmado Playero Pectoral Playero Pata Larga Playero Occidental Playero de Bairdii Zarapito Trinador Vuelve Piedras Playerito Pico Fino	LESSER YELLOWLEGS GREATER YELLOWLEGS SPOYTTED SANDPIPER SANDERLING SEMIPALMATED SANDPIPER PECTORAL SANDPIPER STILT SANDPIPER WESTERN SANDPIPER BAIRD’S SANDPIPER WHIMBREL RUDDY TURNSTONE LEAST SANDPIPER
RINCHOPIDAE (RAYADORES) <i>Rinchops niger</i>	M.n	Rayador	BLACK SKIMMER
LARIDAE (GAVIOTAS) <i>Larus pipixcan</i> <i>Larus cirrocephalus</i> <i>Larus serranus*</i> <i>Larus belcheri</i> <i>Larus dominicanus</i> <i>Larus modestus</i> <i>Larus atricilla*</i>	M.n M.n M.n M.n M.n M.n M.n	Gaviota de Franklin Gaviota Capucha Gris Gaviota Andina Gaviota Peruana Gaviota Dominicana Gaviota Gris Gaviota Centroamericana	FRANKLIN’S GULL GRAY-HEADED GULL ANDEAN GULL BAND-TAILED GULL KELP’GULL GRAY GULL LAUGHING GULL
STERNIDAE (GAVIOTINES) <i>Sterna hirundo</i>	M.s	Gaviotin Común	AMERICAN TERN

<i>Sterna elegans</i>	M.n	Gaviotin elegante	ELEGANT TERN
<i>Sterna sandvicensis</i>	M.n	Gaviotin Patinegro	SANDWICH TERN
<i>Larosterna inca</i>	R.l	Zarcillo	INCA TERN
<i>Sterna lorata*</i>	R.l	Gaviotin Peruano	PERUVIAN TERN
COLUMBIDAE (PALOMAS)			
<i>Zenaida Meloda</i>	R.r	Cuculi	WEST PERUVIAN DOVE
<i>Zenaida auriculata*</i>	R.l	Tortolita Rabiblanca	EARED DOVE
<i>Columbina cruziana</i>	R.l	Tortolita Peruana	CROAKING GROUND-DOVE
PSITTACIDAE (LOROS)			
<i>Psilopsiagon aurifrons*</i>	M.a	Perico Cordillerano	MOUNTAIN PARAKEET
CUCULIDAE (CUCOS)			
<i>Crotophaga sulcirostris</i>	R.r	Guardacaballo	GROOVE-BILLED ANI
TYTONIDAE (LECHUZAS BLANCAS)			
<i>Tyto alba*</i>	R.l	Lechuzas de Campanarios	BARN OWL
STRINGIDAE (LECHUZAS)			
<i>Atiencunicularia</i>	R.r	Lechuza de las Arenas	BURROWING OWL
TROCHILLIDAE (PICAFLORES)			
<i>Amazilia amazilia</i>	R.l	Amazilia Costeña	AMAZILIA HUMMINGBIRD
<i>Rhodopis vesper*</i>	R.l	Picaflor Cola ahorquillada	OASIS HUMMINGBIRD
<i>Thaumastura cora</i>	R.l	Picaflor de Cora	PERUVIAN SHEARTAIL
<i>Chordeiles acutipennis</i>	R.l	Chotacabras Trinador	LESSER NIGHTHAWK
FURNARIIDAE (FURNARIDOS)			
<i>Phleocryptes melanops</i>	R.r	Totorero	WREN-LIKE RUSHBIRD
<i>Geositta peruviana</i>	R.r	Pampero peruano	COASTAL MINER
TIRANNIDAE (ATRAPAMOSCAS)			
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	R.r	Turtupilin	VERMILION FLYCATCHER
<i>Tachuris rubrigastra</i>	R.r	Siete Colores	MANY-COLORED RUSH TYRANT
<i>Muscisaxicola macloviana</i>	M.a	Domilona Cabeza Oscura	DARK-FACED GROUND TYRANT
<i>Muscigralla brevicauda*</i>	R.l	Domilona Cola Corta	SHORT-TAILED FIELD-TYRANT

<p>HIRUNDINIDAE (GOLONDRINAS)</p> <p><i>Pygochelidon cyanoleuca</i></p> <p><i>Hirundo rustica</i></p> <p><i>Progne subis</i></p> <p><i>Petricholidon pyrrhonota*</i></p>	<p>R.l</p> <p>M.n</p> <p>M.n</p> <p>M.n</p>	<p>Golondrina Sta Rosita</p> <p>Golondrina Migratoria</p> <p>Golondrina Azulnegra</p> <p>Golondrina risqueta</p>	<p>BLUE-AND-WHITE SWALLOW</p> <p>BARN SWALLOW</p> <p>PURPLE MARTIN</p> <p>CLIFF SWALLOW</p>
<p>TROGLODITIDAE (CUCARACHEROS)</p> <p><i>Troglodytes aedon</i></p>	<p>R.r</p>	<p>Cucarachero</p>	<p>HOUSE WREN</p>
<p>MOTACILLIDAE (CACHIRLAS)</p> <p><i>Anthus lutescens</i></p>	<p>R.r</p>	<p>Chichire</p>	<p>YELLOWISH PIPIT</p>
<p>COEREBOIDAE (MIELEROS)</p> <p><i>Conirostrum cinereum*</i></p>	<p>R.l</p>	<p>Mielerito Gris</p>	<p>CINEREOUS CONEBILL</p>
<p>ICTERIDAE (TORDOS)</p> <p><i>Molothrus cinereus</i></p> <p><i>Dives Warszewiczi</i></p> <p><i>Sturnella bellicosa</i></p> <p><i>Agelaius icterocephalus*</i></p>	<p>R.l</p> <p>R.l</p> <p>R.l</p> <p>R.r</p>	<p>Tordo parásito</p> <p>Tordo Grande</p> <p>Pecho Colorado</p> <p>Chiroca Cabeza Amarilla</p>	<p>SHINY COWBIRD</p> <p>SCRUB BLANCKBIRD</p> <p>PERUVIAN MEADOWLARK</p> <p>YELLOW-HOODED BLACKBIRD</p>
<p>FRINGILLIDAE (SEMILLEROS)</p> <p><i>Volatinia jacarina</i></p> <p><i>Sporophila simplex</i></p> <p><i>Sporophila peruviana*</i></p> <p><i>Sporophila telasco*</i></p> <p><i>Sicalis luteola</i></p> <p><i>Carduelis magellanica</i></p> <p><i>Pospiza hispaniolensis*</i></p> <p><i>Zonotrichia capensis</i></p>	<p>R.l</p> <p>R.l</p> <p>R.l</p> <p>R.l</p> <p>R.r</p> <p>R.l</p> <p>M.a</p> <p>R.l</p>	<p>Saltapalito</p> <p>Espiguero Simple</p> <p>Espiguero pico largo</p> <p>Espiguero corbaron</p> <p>Triguero</p> <p>Jilguero Cabeza Negra</p> <p>Dominiqui Común</p> <p>Gorrión Americano</p>	<p>BLUE-BLACKGRASSQUIT</p> <p>DRAB SEEDEATER</p> <p>PARROT-BILLED SEEDEATER</p> <p>CHESNUT-THROATED SEEDEATER</p> <p>GRASSLAND YELLOW-FINCH</p> <p>HOODED SISKIN</p> <p>COLLARED WABLING-FINCH</p> <p>RUFIOUS-COLLARED SPARROW</p>
<p>PLOCEIDAE (GORRIONES)</p> <p><i>Passer domesticus</i></p>	<p>R.l</p>	<p>Gorrión Europeo</p>	<p>HOUSE APARROW</p>

ESPECIES CON DOS O MENOS OBSERVACIONES			
<i>Fregata magnificens</i>	M.n	Fragata	MAGNIFICENT FRIGATEBIRD
<i>Ajaia ajaja</i>	M.n	Espatula rosada	ROSEATE SPOONBILL
<i>Sarkidiornis melanotos</i>	M.a	Pato Arrocero	COMB DUCK
<i>Sterna maxima</i>	M.n	Gaviotin Real	ROYAL TERN
<i>Buteo platypterus</i>	M.n	Aguilucho Aliancha	BROAD-WINGED HAWK SPOT-
<i>Columba maculosa</i>	M.a	Paloma Cenicienta	WINGED PIGEON SCARLET-
<i>Aratinga wagleri</i>	R.l	Cotorra Frente Roja	FRONTED PARAKEET
<i>Chaetura pelagica</i>	R.l	Vencejo de Chimeneas	CHIMNEY SWIFT
<i>Progne murphy</i>	R.l	Golondrina Negra	PERUVIAN MARTIN
<i>Petrochelidon Rufocollaris</i>	R.l	Golondrina	CHESTNUT-COLLARED
<i>Tyrannus savana</i>	R.l	Cuellicastaño Tijereta	SWALLOW
		Sabana	FORK-TAILED FLYCATCHER

LEYENDA

R.r.- Residente. Se reproduce en Puerto Viejo.

R.l.- Residente. Se reproduce relativamente cerca de la zona y se moviliza también en rangos relativamente cortos.

M.a.- Migratorio. De la zonas altoandina.

M.s.- Migratorio. De la parte sur del continente.

M.n.- Migratorio. Del norte de América.

*.- Poco común, hay que reportarlo.

**.- Necesita confirmación.

Fuente: Municipalidad de San Antonio. Cañete. Archivos demográficos de aves silvestres. 2005.

2.8 TRANSMISIÓN

Los VIA se transmiten fácilmente entre las aves; sin embargo el mecanismo por el cual los virus pasan de un animal a otro es pobremente entendido (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009). Según Alexander (2007a) la transmisión es muy compleja y depende de la cepa viral, especie de ave y los factores ambientales (Ver apéndice 2.7.1). Algunas referencias reportan que la transmisión viral en forma general puede producirse principalmente de la siguiente manera:

- Por contacto directo con secreciones de aves infectadas, especialmente heces (ruta fecal-oral) siendo más eficiente en espejos de agua dulce con bajas temperaturas (Stallknecht y Brown, 2007; Espinal, 2007; USDA, 2007).
- Por contaminación del ambiente; alimento, agua, equipos y ropa contaminados con secreciones de aves infectadas (Espinal, 2007; NABC - Kansas State University, 2009).
- Por aves silvestres acuáticas y marinas clínicamente normales que pueden introducir el virus a las granjas avícolas (García *et al.*, 2006).

- Por huevos rotos contaminados que pueden infectar a los pollitos en la planta de incubación (Capua y Marangon, 2006a).
- Por el compromiso humano, el comercio de aves silvestres (Karesh *et al.*, 2005) los productos, ó por transferencia de desechos infectivos a aves susceptibles (Bird life International, 2005).
- Por contacto de hospederos no específicos como porcinos domésticos; aves de compañía ó mascotas (USDA, 2007), e inclusive insectos como vectores mecánicos de los virus (OIE, 2009).
- Por comercio de productos contaminados, por medio de un viajero infectado; y hasta por casos de bioterrorismo (USDA, 2007).

La excreción viral puede comenzar 1 ó 2 días después de la infección (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009); por otra parte estudios experimentales realizados por Swayne y Halvorson, (2003) demostraron que los virus replicaron y se excretaron de patos asintomáticos hasta por 30 días, de pollos hasta por 36 días y de pavos hasta por 72 días; además según Ziegler *et al.*, (1999) en poblaciones de aves permanentes los virus pueden ser mantenidos en operaciones agrícolas y pueden emerger después de algún evento de estrés.

La persistencia de los virus en materia orgánica es variable. A pesar de haberse reconocido la importancia de la transmisión oral/fecal en poblaciones de aves silvestres, existen datos de que su persistencia en agua es extremadamente limitada (Stallknecht y Brown, 2007). Esta persistencia viral fue evaluada en heces por Beard *et al.*, en 1984 y Lu *et al.*, en el 2003; y en fluido alantoideo por Lu *et al.*, en el 2003, y en todos los casos la infectividad fue relativamente corta (días); sin embargo estudios realizados por Stallknecht *et al.*, (1990b,c) y Brown *et al.*, (2007) quienes evaluaron la persistencia viral en el agua, demostraron que los virus (incluyendo los virus H5N1 de IAAP y otros subtipos en aves silvestres) pueden persistir por períodos extendidos.

Las aves silvestres podrían transmitir los VIABP a las aves de corral a través de especies puente o por contacto directo en hábitats compartidos (ej. producción avícola extensiva en arrozceras de Asia), o en mercados de aves vivas (también comunes en Asia) (CENAVECE). Los virus que se encuentran en heces frescas contaminan el suelo y agua de los lagos y canales, en donde las aves domésticas, principalmente aquellas criadas en espacios abiertos, buscan alimento y consumen agua. Los patos y gansos domésticos así como los pavos aparentemente son las aves que resultan inicialmente infectadas (García, 2006).

Los virus se difunden con cierta facilidad hasta alcanzar gallináceas que se crían en traspatio y de ahí llegan a explotaciones comerciales de pollos de engorde y gallinas de postura donde la difusión es muy rápida, debido a los sistemas de manejo que movilizan al virus entre granjas (García, 2006). Una vez que infectan a las aves de granja, los virus encuentran una gran cantidad de hospederos susceptibles lo que favorece su rápida replicación, la aparición de “errores” y su transformación a formas de alta patogenicidad (Smith *et al.*, 2006).

La transmisión de los VIAAP tiende a ser más pobre por la rápida mortalidad que produce en gallináceas no dando tiempo a la eliminación viral, a diferencia de los VIABP (Alexander, 2007a; Linzito *et al.*, 2005); no obstante Brown *et al.*, (2007) concluye que la disminución en la transmisión asociada con la baja eliminación viral (especialmente de la cloaca) y las condiciones ambientales del agua no influyeron necesariamente en la habilidad de los virus para transmitirse a dosis infecciosas muy bajas; además para Webster *et al.*, (2006) algunas aves silvestres podrían estar transmitiendo directamente los VIAAP a las aves domésticas tal como fue observado en la propagación del virus del Sudeste asiático hacia occidente.

La transmisión horizontal de los virus ocurre comúnmente. Por esto Easterday, *et al.*, (1997); sugirió que la transmisión potencial de virus proveniente de aves silvestres enfatiza la necesidad a los criadores a proveer la separación de sus aves comerciales con estas poblaciones. Por otra parte Swayne y Halvorson, (2003) menciona que la transmisión vertical no se produce; sin embargo Capucci, *et al.*, (1985) recuperó el agente de la superficie y del interior de los huevos de gallinas con infecciones experimentales.

Finalmente la CFSPH/ IICAB / OIE, (2009) menciona que la transmisión entre especies es rara, pero puede producirse ocurriendo una epidemia o pandemia, porque el nuevo hospedero no tiene inmunidad contra el nuevo virus. Para que se produzca una epidemia de IA deben existir tres requisitos:

- 1).- Los virus deben surgir en una especie con poca ó ninguna inmunidad a ese subtipo,
- 2).- Los virus deben producir enfermedad en esa especie, y
- 3).- Debe haber transmisión sostenible en la nueva especie.

2.9 PATOGÉNESIS

Debido a la complejidad de los VIA, la patogénesis involucra una serie de aspectos como; las características antigénicas; la entrada viral y replicación; la variación antigénica y la respuesta inmune; y los efectos patogénicos.

2.9.1 Características antigénicas

La H y N son las proteínas antigénicas principales que participan en el proceso de infección, ambas estimulan la formación de anticuerpos protectores; principalmente la H (Lamb y Drug, 2001). Por otra parte los antígenos H se adhieren a los receptores celulares, hemaglutinan los glóbulos rojos; y los antígenos N permiten la elusión viral de la célula hospedera (Swayne y Halvorson, 2003).

La H es el principal determinante. Es una proteína glucosilada y acilada que forma homotrímeros sobre la superficie viral, y presenta 4-5 epítopes ó sitios antigénicos dominantes que se unen a los sialo-liposacáridos de los receptores en la membrana celular, induciendo anticuerpos neutralizantes específicos (Fauquet *et al.*, 2004; Kaverin *et al.*, 2004); además presenta un dominio de fusión necesario para la liberación del ARN en la célula huésped durante la replicación viral, vital para su transmisión (Matrosovich, *et al.*, 1999). Por otra parte la N es una sialidasa que evita la formación de agregados de los viriones que emergen de la membrana celular en el proceso de gemación, mediante remoción del ácido siálico de la superficie celular y digestión de los enlaces del ácido neuramínico entre la membrana del virus y la célula huésped (Lamb y Drug, 2001) (Ver Figura 01).

Otras proteínas importantes son la M2 y NS1. La M2 forma un canal iónico para el incremento de la concentración de iones dentro de la partícula viral, reduciendo el pH y facilitando la fusión a la membrana del endosoma por la H activada; esto permite liberar el ARN viral al interior de la célula (Betakova *et al.*, 2005). Por otra parte la NS1 (proteína no estructural) solo es producida durante la infección viral e inhibe el transporte del ARNm de la célula, permitiendo el transporte del ARN viral a los ribosomas para su traducción. Su actividad se relaciona con la evasión a la respuesta inmune innata porque la inhibe siendo antagonista del interferón alfa (Palese *et al.*, 2002).

2.9.2 Entrada viral y replicación

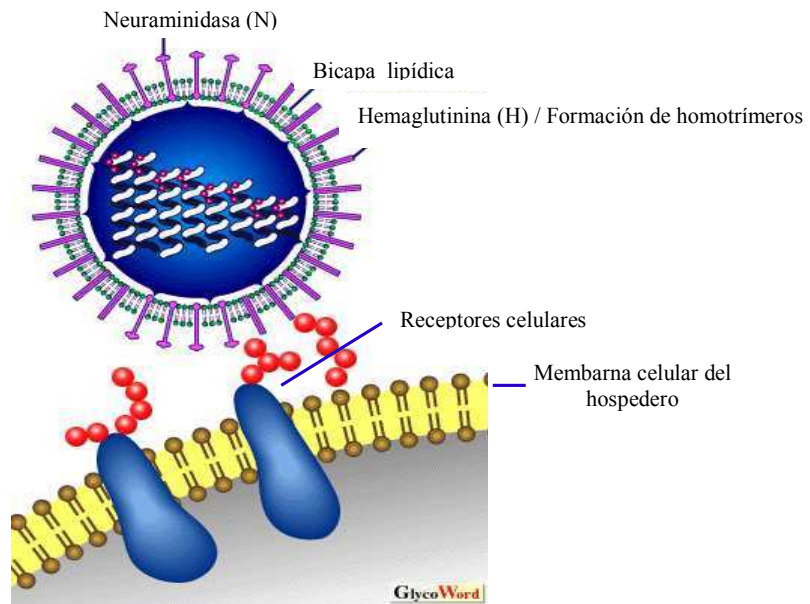
La entrada del virus se produce por vía respiratoria u oral, y se replica primariamente en células epiteliales de los pulmones, tejidos linfoides y otros órganos viscerales como los riñones y páncreas (Tollis y Triani, 2002); esta actividad varía de acuerdo a la cepa viral.

Dentro del organismo, la H permite que las células epiteliales del huésped adsorban el virus, luego este las invade y destruye (Hidalgo, 2005). Después que la

célula interactúa con la H viral, el virión es endocitado y encerrado en una vesícula denominada endosoma (Fig. 04, Fig. 05 (1)). La H del virus con sitio de partición multibásico es activada por furinas y una endoproteasa como la subtilisina (Stieneke - Grober *et al.*, 1992). El bajo pH, produce un cambio conformacional de la H (partición en H1 y H2), lo que facilita la fusión de la membrana viral y la vesícula endocítica, permitiendo al virión liberar su contenido al citoplasma celular (Fig. 05 (2, 3)) (Linzito *et al.*, 2005); esto va relacionado con su patogenicidad (Bosch *et al.*, 1981).

La NC viral es transportada al núcleo celular y su polimerasa asociada comienza la transcripción primaria del ARNm. Los transcriptos son usados para la traducción de proteínas virales tempranas nucleoproteínas (NP) y proteínas no estructurales (NS1) (Palese y García, 1999). La transcripción se inicia con 10 a 13 nucleótidos de fragmentos ARN generados del ARN nuclear heterogéneo del hospedero vía actividad viral endonucleasa de la PB2 (Lamb y Krug, 2001).

Figura 04. Disposición de la HA y NA de los VIA en la célula hospedera



Fuente: www.glycoforum.gr.jp

Seis ARN_ms monocistrónicos son producidos en el núcleo y son transportados al citoplasma para la traducción de proteínas en H, N, NP, proteína de unión (PB1, PB2) y proteína A (PA). Los ARN mensajeros de los segmentos génicos de las proteínas no estructurales (NS) y de las proteínas de membrana (M), sufren cada uno hendiduras produciendo 2 ARN_ms, y se traducen en proteínas NS1, NS2, M1 y M2 (Palese y García, 1999). Por otra parte las proteínas H y N son glucosiladas en el retículo endoplasmático rugoso, cortados en el Golgi y transportados a la superficie donde son embebidos en la membrana plasmática (*op. cit.*) (Fig. 05 (4, 5, 6)).

Los ocho segmentos génicos virales solitarios con las proteínas virales internas (NP, PB1, PB2, PA, M2) se ensamblan y migran a las áreas de la membrana plasmática conteniendo las proteínas integradas H, N y M2 (Lamb y Krug, 2001). El ensamble de las nuevas partículas se produce en el citoplasma (Fig. 05 (7, 8, 9, 10)). La NC es encerrada por una cubierta de M1 y brota fuera de la célula usando la membrana celular como parte de su envoltura junto con las glicoproteínas de superficie (Linzito *et al.*, 2005) (Fig. 05 (11, 12, 13, 14, 15, 16)). Finalmente los virus son liberados de las células por actividad de la N (Herrero - Uribe, 2008) (Fig. 05 (17, 18, 19)).

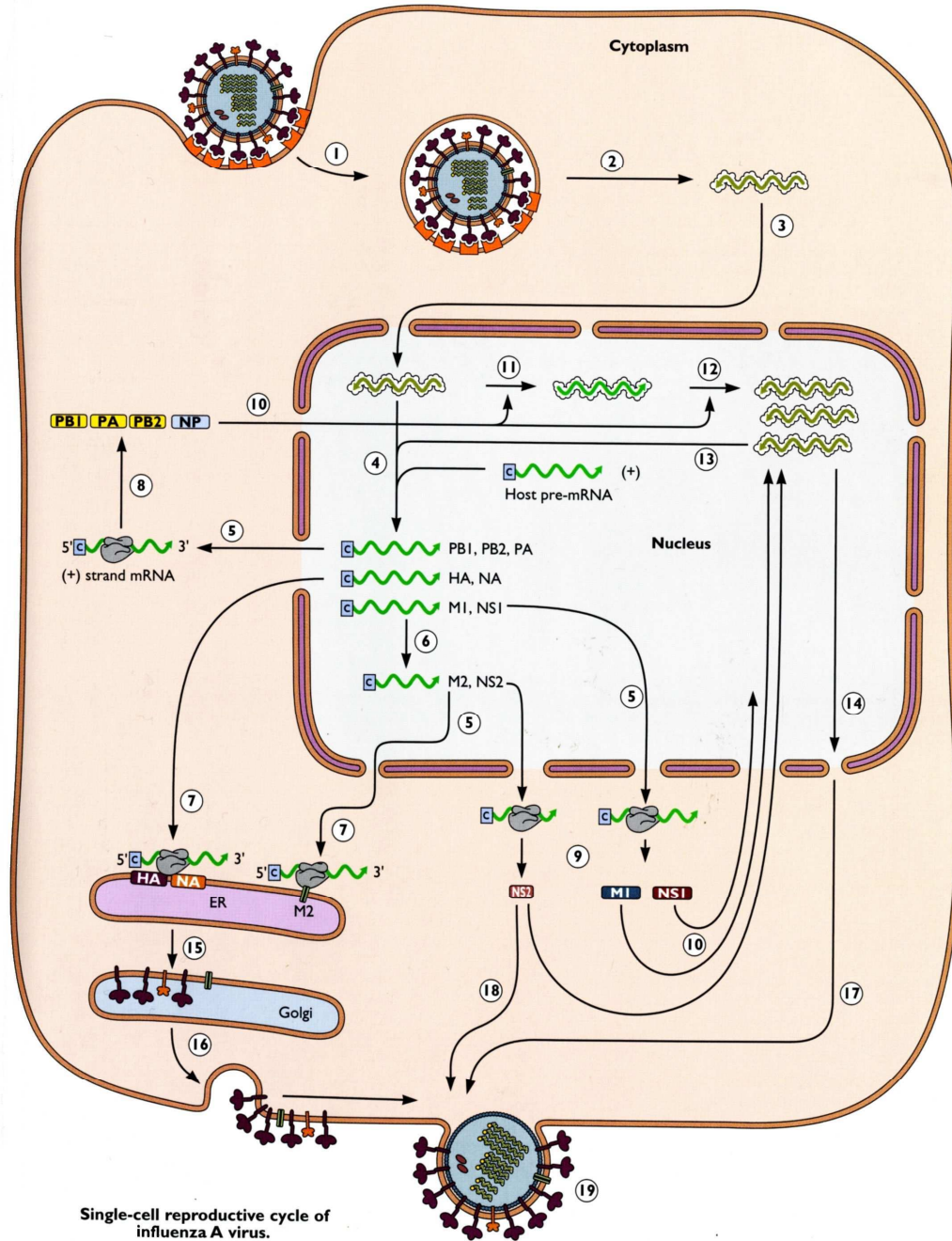
La proteína M1 modula la direccionalidad del transporte de las rubonucleoproteínas virales (RNP) dentro y fuera del núcleo. Durante la entrada del virus a la célula hospedera, la proteína M1 disociada de las RNPs permite al virus entrar al núcleo (Martin y Heleniust, 1991). La actividad del canal de ion de la proteína M2 afecta el transporte a través del Aparato de Golgi (Fig. 05 (7,15)). Los altos niveles de expresión de la proteína de canal de iones M2 inhibe el porcentaje de transporte intracelular de la H viral y de otras glicoproteínas de la membrana integral (Sakaguchi *et al.*, 1996).

2.9.3 Variación antigénica y respuesta inmune

2.9.3.1 Variación antigénica.-

Los cambios antigénicos principalmente se traducen en modificaciones de sus 2 glicoproteínas superficiales. Los virus tienen gran variabilidad genética, con una elevada tasa de mutaciones (más de 5×10^{-5}), y cambios de nucleótidos en los ciclos de replicación (Drake, 1993; Voyles *et al.*, 2002). Esto se relaciona con la utilización de un ARN polimerasa para su replicación que es dependiente del virus, que presenta errores de copia y tiene poca capacidad correctora (Herrero - Uribe, 2008); lo que se traduce en sustituciones de aminoácidos en las proteínas de la envoltura viral (fundamentalmente la H y N) originando virus con variantes antigénicas o de patogenicidad (Noda, 2006).

Figura 05. Ciclo de replicación de los VIA



Rodriguez, 2006

Esta variabilidad se traduce en sustituciones de aminoácidos en las proteínas de la envoltura viral, fundamentalmente la H y N, que pueden originar el surgimiento de variantes antigénicos o de patogenicidad (Perdue *et al.*, 1997; Kaverin *et al.*, 2002; Suarez *et al.*, 2004), determinando en ocasiones origen de cepas de alta patogenicidad en los subtipos virales H5 y H7, y emergiendo esporádicamente a epidemias y pandemias de influenza tipo A en aves y también en mamíferos (incluyendo al hombre) (Webster *et al.*, 1992). Este fenómeno ocurre en los epítopes de menor magnitud y de forma gradual por la selección de mutantes.

Webster *et al.*, (2007) menciona que los cambios antigénicos pueden ser resultado de tres mecanismos;

- a).- Por reordenamiento genético entre los subtipos.
- b).- Por transferencia directa de un virus completo de una especie hospedadora a otra.
- c).- Por reaparición de un virus encontrado anteriormente en una especie, que ya no está en circulación.

Según Berrios, (2002); Linzito *et al.*, (2005); Herrero - Uribe, (2008); la variación antigénica puede ser de 2 tipos:

- **Drift ó deriva antigénica.**- son modificaciones menores del genoma, que ocurren muy gradualmente en los miembros de un mismo subtipo durante la replicación viral (sustituciones en bases de aminoácidos en los sitios antigénicos de la molécula); y son responsables de epidemias en cada temporada anual, obligando a reformular la composición de vacunas cada año, de acuerdo con las cepas estudiadas por los centros de vigilancia de la OMS.
- **Shift ó antigénico.**- son cambios mayores del genoma, por recombinación de alta frecuencia o intercambio completo de sus segmentos en diferentes virus durante una infección mixta, originando cepas con nuevas H y N; nuevos subtipos (virus híbridos) con alta virulencia y desconocidos por el sistema inmune. Estas variaciones pueden ocurrir entre los virus de influenza aviar, influenza porcina, equina y humana, y son responsables de pandemias.

Los factores que originan la mutación viral no se conocen hasta el momento. En algunos casos la mutación puede ser rápida en aves domésticas después de la transmisión de los virus por aves silvestres (Espinal, 2007); en otros los virus bajamente patógenos han circulado varios meses antes de la mutación (Alexander, 2007a). No obstante, García (2009) mencionó que las aves domésticas son especies aberrantes, e

inducen a la mutación de los virus como un mecanismo de adaptación para una óptima replicación y transmisión en la nueva especie.

Se consideró la hipótesis que el gen de H de los serotipos H5 y H7 tienen distinta estructura secundaria del ARN, lo que favorece la adquisición de virulencia, y la mutación por dos mecanismos: a).- Inserción de nucleótidos (duplicación de codones) por copias repetidas de la polimerasa viral de una secuencia rica en purinas que codifica el sitio de procesamiento proteolítico de la H (Perdue y Suarez, 2000); b).- Sustitución de nucleótidos o recombinación que permiten la introducción de residuos de aminoácidos adicionales (Suarez, 1998).

La mutación, inserción, delección, reordenación y la clásica recombinación, influyen en la variabilidad de los virus (Webster *et al.*, 2007a). La inserción, delección y recombinación se ha detectado en mamíferos y en aves domésticas; pero no en aves silvestres (Noda, 2006). La inserción se ha presentado en los subtipos H5 y H7, cuando los aminoácidos básicos adicionales son insertados en el sitio de corte de la H, incrementando la patogenicidad. La delección se presenta en el tallo de la N, y se asocia con el balance y la estabilidad de la H y la N durante la adaptación (Matrosovich *et al.*, 1999). La recombinación comprende la prolongación de los péptidos de H, por adición de otro segmento de genes (Suarez *et al.*, 2004; Pasick *et al.*, 2005).

La deriva genética gradual (mutación) de los subtipos virales puede ocurrir y un subtipo en particular puede convertirse y adaptarse para infectar a otras especies de aves silvestres y domésticas, aunque inicialmente no cause enfermedad en el nuevo organismo huésped (Brown *et al.*, 2006). El cambio del fenotipo de VIABP común en aves silvestres y aves domésticas a un virus con fenotipo de VIAAP, es producido por la introducción de residuos de aminoácidos básicos en el sitio de partición de la H, facilitando la replicación sistémica del virus por un aumento en la partitibilidad de la H fuera del tracto respiratorio e intestinal (Alexander, 2000). Esto sugiere que el virus no está en estado constante y puede mutar mediante la variación de sus glicoproteínas externas, tal como lo reportó Herrero - Uribe, (2008).

El reordenamiento (“reassortment”) de los genes o su recombinación se produce cuando una célula es infectada con dos o más virus diferentes originando cepas de virus que difieren de las progenitoras (Webster y Hulse, 2004). Los cambios en el genoma pueden traducirse en cambios de las proteínas relacionadas con variaciones antigénicas o de patogenicidad cuando se producen en el gen de H o N, y si son en genes internos se traducen en cambios de patogenicidad y su potencial para la transmisión entre especies

(Noda, 2006). Otros mecanismos pueden ser la sustitución de nucleótidos de los aminoácidos y en menor proporción la inserción de nucleótidos sin repetición (*op. cit.*).

Los rearrreglos genéticos o la recombinación entre los VIABP en un hospedero común, pueden aumentar su virulencia y alcanzar nuevas características biológicas, siendo más contagiosos en gallináceas (dependiendo de la densidad), produciendo brotes de la enfermedad con mortalidades de hasta 100% (USDA, 2007; Whitworth *et al.*, 2007); no obstante a pesar de que el ARN segmentado de los virus pueden producir teóricamente 256 combinaciones del genoma por entrecruzamiento de sus ocho segmentos génicos; pocas son las combinaciones que logran un número de genes potencialmente viables en la naturaleza (Horimoto y Kawaoka, 2001).

La virulencia de los virus en aves domesticas provenientes de virus de aves acuáticas fue reportado por Ito *et al.*, (2001); probablemente los cambios en otros genes virales y adquisición de partitibilidad en la H, serían factores para esta evolución (*op. cit.*). Por otra parte la emergencia de VIAAP por adquisición de una zona multibásica en el sitio de partición fue reportado por Tollis y Triani en el 2002, quienes además encontraron que la supresión de 22 aminoácidos en el terminal N, seguido de la adquisición de sitios de glicosilación adicional cerca al sitio receptor de unión a la HA1, era resultado de una presión selectiva que ocurre durante la replicación de virus originario de aves silvestres reservorias.

La ausencia de zonas endémicas con VIAAP en aves comerciales disminuye la probabilidad que ocurran los cambios Shift, sin embargo estas mutaciones también se han producido también con infecciones de cepas bajamente patógenas (Convención sobre las especies migratorias, 2008); tal como se reportó en Hong Kong por la H5N1 en pollos, gansos y en patos salvajes (Swayne y Halvorson, 2003). Dichas mutaciones serían facilitadas en situaciones que involucren a las aves de corral en condiciones de hacinamiento, con altas densidades y falta de higiene (Wetlands International Globalsite, 2007). Asimismo Guana *et al.*, (2002) determinaron que existen re arreglos genéticos entre los virus H5N1 en gansos y patos.

Las derivas genéticas graduales probablemente ocurrieron en aves comerciales de Italia y EEUU (Seene y Suárez, 2006). Por otra parte en Chile y Canadá, las mutaciones de las cepas altamente patógenas H7N3 probablemente ocurrieron por cambios en los sitios de partición de los aminoácidos de la H; como consecuencia de la recombinación con otros genes de las nucleoproteínas y de la matriz, resultando en una

inserción en el sitio de partición de 11 aminoácidos para el virus de Chile y 7 aminoácidos para el virus de Canadá (Alexander, 2007a).

2.9.3.2 Respuesta inmune

En situaciones reales de epidemias o pandemias, muchas veces la inmunidad no se ha producido porque el hospedero (aves domésticas) no ha reconocido al nuevo virus instalado (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009); por el contrario muchas aves silvestres pueden ser parcialmente inmunes debido a exposiciones previas a los VIAAP, tal como lo mostraron en pollos (Soo *et al.*, 2002).

La inmunidad es mediada por la respuesta humoral y celular. La inmunidad activa por infección ó inmunización contra los VIA genera una respuesta de anticuerpos tanto a nivel sistémico y mucoso, que incluye una respuesta de IgM a los 5 días post infección, seguido de una respuesta corta de IgG. La inmunidad pasiva aún no ha sido reportada (Swayne y Halvorson, 2003).

En la respuesta humoral, los anticuerpos neutralizantes son producidos contra las proteínas superficiales H, N y M2; actuando contra la infección y la enfermedad (Tollis y Triani, 2002). Los anticuerpos inducidos por la M2 aunque no son neutralizantes reducen la penetración viral y por tanto pueden producir protección parcial (Noda, 2006). La NS1 puede inducir anticuerpos útiles para diferenciar aves vacunadas de infectadas en programas de vacunación (*op. cit.*).

La producción de anticuerpos es variable en las especies de aves. Según Tollis y Triani (2002) en pollos es más alto que en otras especies domésticas. Por otra parte Swayne y Halvorson (2003) reportaron que la H estimula anticuerpos protectivos contra los signos clínicos protegiendo hasta 35 semanas in vivo, y los anticuerpos a N protegen contra los subtipos homólogos, pero en menor grado. No obstante ambos protegen contra signos clínicos y muerte por desafío con VIAAP.

Existen pocos estudios sobre la inmunidad celular; sin embargo Suarez y Schultz-Cherry *et al.*, (2000) demostraron que las células T fueron reconocidas como el principal efector celular para la protección inmune; es así que la respuesta de linfocitos T citotóxicos pudo reducir la expulsión viral en ratones infectados con VIAAP. En esa línea Tollis y Triani, en el 2002; encontraron que la respuesta celular inducida por la vacunación con virus H9N2, protegió contra los signos clínicos de infección por H5N1 en pollos, pero no evitó la eliminación viral en heces perpetuándose su circulación. Por

otra parte Swayne y Halvorson (2003) reportaron que la respuesta inmune contra las proteínas internas del virus es predominantemente celular.

Finalmente Jackson *et al.*, (1994) determinaron que la presencia de sitios de glicosilación en la H del virus, afecta su reconocimiento por las células B y T. Además los oligosacáridos en su punta distal pueden reducir su unión al receptor, afectando la toma por las células presentadoras de antígeno (Eisenlohr *et al.*, 1987).

2.9.4 Efecto patogénico

Según algunos autores la patogenicidad del virus se debe a dos mecanismos:

- 1).- Cuando la H tiene una cadena de aminoácidos básicos (arginina o lisina con un sitio de partición enzimática, como resultado de la aparente inserción ó sustitución [3-5]), es fácilmente "reconocida" por proteasas celulares ubicuas en el huésped (probablemente actúen endoproteasas como las furinas) (Rott *et al.*, 1995; Perdue *et al.*, 1997); consecuentemente los virus penetran cualquier tipo de células invadiendo diferentes tejidos y órganos, provocando un cuadro clínico sistémico prácticamente mortal (Stieneke -Grober, *et al.*, 1992).
- 2).- Cuando la H no tiene la cadena de aminoácidos básicos (solamente la arginina en el sitio de partición enzimática y otro aminoácido básico con unión [-3 ó -4]) y solamente es "reconocida" por la proteína tripsina, que se encuentra en el tracto respiratorio y digestivo de las células hospederas, consecuentemente los virus solo invaden estos tejidos, produciendo cuadros semejantes a gripes sin gravedad para las aves (Stieneke -Grober, *et al.*, 1992; Kuiken *et al.*, 2006).

Según Herrero - Uribe (2008), el daño causado por los virus es el resultado de tres procesos:

- 1.- Replicación directa de los virus en células, tejidos y órganos.
- 2.- Efectos indirectos de la producción de mediadores celulares como citoquinas.
- 3.- Isquemia por trombosis vascular.

Los daños patológicos a nivel celular se producen por 2 mecanismos: necrosis y apoptosis. La necrosis se ha asociado con la replicación viral interna en el núcleo y citoplasma (Swayne y Halvorson, 2003); y se ha identificado en células de los túbulos renales, epitelio pancreático, miocitos cardiacos, células corticales adrenales y epitelio pulmonar (*op. cit.*). La apoptosis se ha demostrado en cultivos celulares y compromete varias citoquinas incluyendo interferón beta, y factor de crecimiento transformante beta (Schultz - Cherry *et al.*, 2003).

Los VIAAP no son necesariamente virulentos para todas las especies de aves (Alexander *et al.*, 1986). Esto ocurre especialmente en patos, que no enferman pese a que son rápidamente infectados después de la exposición viral experimental (Alexander, 2007a). Por otra parte a pesar de que se encontró mortalidad en patos silvestres por infecciones en Italia (Pantin *et al.*, 2007), y Asia en forma experimental (Ellis *et al.*, 2004; Kishida *et al.*, 2005); la patogenicidad en esta especie no es consistente entre las diferentes cepas (Pantin *et al.*, 2007).

La patogenicidad de los VIAAP es heterogénea en otras especies (Webster *et al.*, 2006); además nueva evidencia sugiere que la susceptibilidad depende de la experiencia inmunológica a otros VIA (Kalthoff *et al.*, 2008). Cabe señalar que algunos estudios sugieren que los VIAAP pueden llegar a ser bajamente patogénicos en infecciones experimentales en patos, pero son altamente patogénicos en pollos (Hulse-Post *et al.*, 2005; Sturm-Ramirez *et al.*, 2005); no obstante Brandon *et al.*, (2007) reconocieron 4 aislados de VIAAP (por codificación genética) que no mostraron virulencia en pollos.

A pesar de que Capua y Mutinelli, (2001) mostraron que la cepa de VIAAP H7N1 causó mortalidad en patos domésticos Muscovy (*Cairina moschata*) y gansos domésticos (*Anser anser var. Doméstica*), después de la infección natural produciendo daño pancreático y nervioso; Perkins y Swayne (2002), concluyeron que en algunos casos las cepas altamente patógenas H5 y H7 no produjeron enfermedad o muerte.

La patogenicidad de la H5N1 varía en patos de acuerdo a la edad y la cepa viral y se correlaciona con los niveles de replicación en tejidos. Esta ha demostrado ser altamente patogénica para la mayoría de aves silvestres, documentando mortalidad en 105 de las 116 especies (equivalente al 90.7%) de las que se han aislado (NWHC- USDI /USGS, 2009). La infección experimental de patos Pekin con virus A/Duck/Vietnam/12/05 (H5N1) demostró su tropismo en el sistema nervioso y el tejido pancreático con lesiones post mortem evidentes de hemorragias en duodeno, ciego, pro-ventrículo, ventrículo, tráquea, páncreas y cerebro; así como se demostró previamente en otras especies aviares naturalmente (Vascellari *et al.*, 2007).

El daño producido en la IAMP se limita al tracto respiratorio o intestinal, y la enfermedad con muerte se debe mayormente a las infecciones bacterianas secundarias (Swayne y Halvorson, 2003). Ocasionalmente los virus comprometidos se extienden sistémicamente, replicando y causando daño en túbulos renales, epitelio pancreático acinar y otros órganos con células epiteliales que contienen enzimas tipo tripsina (*op. cit.*).

2.10 MANIFESTACIONES CLÍNICO - PATOLÓGICAS

Las manifestaciones clínico patológicas de la enfermedad pueden ayudar a un diagnóstico presuntivo de la enfermedad, sin embargo se debe tener en cuenta los antecedentes y su confirmación con las pruebas de laboratorio (Linzito *et al.*, 2005).

2.10.1 Signos clínicos

No existen síntomas patognomónicos de la IA. Los signos pueden ser compatibles con otras enfermedades (Sánchez *et al.*, 2008). Estos varían de acuerdo al hospedero, cepa viral, estado inmune, presencia de microorganismos secundarios exacerbantes y factores ambientales (Martin *et al.*, 2007). Por otra parte el periodo de incubación varía dependiendo de la dosis viral, ruta de exposición, especie susceptible, y la habilidad de detectar los signos clínicos (Buscaglia, 2004).

El periodo de incubación de la enfermedad es desde pocas horas en una infección experimental mediante inoculación intravenosa ó 3 días en individuos naturalmente infectados, hasta 14 días en un lote (Easterday, *et al.*, 1997; Alexander, 2007b). La OIE señala que para fines de comercio internacional y vigilancia epidemiológica, el periodo máximo de incubación puede ser hasta de 21 días.

La mayoría de infecciones en aves domésticas son causados por VIABP o virus no patógenos (Martin *et al.*, 2007) los que producen nula, débil ó moderada enfermedad, manifestada por una variedad de signos respiratorios, entéricos o reproductivos (dependiendo de la cepa) (Buscaglia, 2004; Alexander, 2007b; Beldoménico y Uhart, 2008), con disminución en la producción de huevos (Martin *et al.*, 2007); pero en el caso de los VIAAP (producto de una infección o mutación genética) se produce una enfermedad sistémica severa con alta mortalidad y hasta muerte súbita (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009).

En aves domésticas, algunos cuadros bajamente patógenos pueden estar asociados a otras enfermedades graves con elevada mortalidad (Alexander, 2007b); sin embargo según Whitworth *et al.*, (2007) los signos mayormente son poco visibles y algunos brotes bajamente patógenos pueden no ser detectados clínicamente a menos que las pruebas de laboratorio muestren seroconversión.

De acuerdo a Buscaglia, (2004) y Martin *et al.*, (2007) en aves domésticas sobretudo en pollos y pavos, la enfermedad de alta, mediana y baja patogenicidad puede presentar los siguientes signos clínicos:

- Morbilidad y mortalidad del 0 al 100% (dentro de las 24 a 48 horas ó hasta una semana) sobretodo en los cuadros altamente patógenos.
- Disminución en la producción de huevos (perdida de la pigmentación, huevos deformes ó fragilidad de la cáscara).
- Problemas respiratorios (sinusitis, tos, estornudos, estertores y lagrimeo).
- Edema peri orbital, de la cara, cresta, y barbillas cianóticas (sobretodo en pavos).
- Depresión (hacinamiento, inactividad).
- Anorexia y emaciación.
- Desordenes nerviosos.
- Diarreas (verdosas ó blancas en algunas aves).
- Equimosis en zancas y patas.

Algunos VIAAP H5N1 han demostrado infectar asintomáticamente a patos de collar y sus derivados domésticos (*Anas platyrhynchos*), y estos transmitirlos a otras aves susceptibles (Sturm-Ramirez *et al.*, 2005). Esto sugiere que los patos pueden estar contribuyendo a la endemidad del VIAAP H5N1 en el sudeste asiático. El punto a dilucidar es si el reservorio son los patos domésticos (*Anas platyrhynchos*) de razas como Pekin o Muscovy; especies silvestres de *Anas platyrhynchos*, otros Anatidae, o ambos (Beldoménico y Uhart, 2008).

En aves silvestres los VIAAP y los VIABP raramente producen cuadros clínicos (Herrero - Uribe, 2008). Estos se presentan con menor frecuencia en patos, gansos y aves acuáticas silvestres infectadas por la mayoría de los VIAAP (Wetlands International Global site, 2007); no obstante se ha observado una sintomatología respiratoria leve en aves adultas jóvenes de algunas de estas especies por la infección con VIAAP con seroconversión a la infección (NABC- Kansas University, 2009).

En otras especies silvestres como cisnes, gaviotas psitácidas y otras aves acuáticas migratorias, la cepa H5N1 también ha demostrado ser muy virulenta tanto en infecciones naturales y experimentales (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009), y los signos pueden ser similares a los que presentan las aves comerciales (Rose *et al.*, 2007).

2.10.2 Lesiones patológicas

La presentación de lesiones puede ser variable. En la forma hiperaguda altamente mortal, a veces son ausentes (Sánchez *et al.*, 2007); sin embargo en las epizootias con enfermedad leve y baja mortalidad están presentes y en forma diversa (Linzito *et al.*, 2005). La severidad de las lesiones por una cepa altamente patógena puede ser más intenso en gallinas, luego en pavos y menos en patos (OIE, 2008). La

patogenicidad de los virus determina su ubicación en el organismo (Buscaglia, 2004). Las cepas menos patógenas van a atacar el aparato respiratorio superior, y a medida que aumenta la patogenicidad afectaran el tracto digestivo, pudiéndose aislar hasta del tejido muscular (*op. cit.*).

Macroscópicamente, los cuadros medianamente patógenos pueden evidenciar inflamación de las vías respiratorias de tipo catarral fibrinosa hasta muco purulenta por infecciones bacterianas secundarias; peritonitis, enteritis, salpingitis y uratosis (Alexander, 2007b). Los cuadros altamente patógenos pueden presentar edema peri-orbital en cabeza y cuello, fluidos de la cavidad oral y nasal, hemorragias equimóticas focales en epicardio, músculos pectorales, mucosa del proventrículo y ventrículo, pulmón y otros; asimismo lesiones necroticas en órganos viscerales como bazo, páncreas, corazón, piel y ovarios; y hasta rotura de la yema en cavidad peritoneal causando severa aerosaculitis y peritonitis en gallinas (FAO, 2007a; NABC-Kansas University, 2009).

Microscópicamente, los cuadros medianamente patógenos pueden evidenciar inflamación con infiltrado linfocitario del tracto respiratorio, depleción linfocítica de órganos y agregados linfoides, con necrosis y apoptosis de linfocitos; a veces se evidencia el antígeno viral en el epitelio respiratorio, túbulo renal o el epitelio pancreático acinar necrosado (Alexander, 2007b); en los cuadros altamente patógenos se pueden observar edema, hiperemia, hemorragias y lesiones necróticas ó inflamatorias más fuertes en tejido cerebral, corazón, pulmón, páncreas y órganos linfoides (Comotto, 2000; Swayne y Halvorson, 2003).

2.11 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Clínicamente los cuadros altamente patógenos deben diferenciarse con una variedad de enfermedades por la muerte súbita (Martin *et al.*, 2007). Los moderadamente patógenos deben diferenciarse de la ENC, LT, Cólera aviar, intoxicaciones agudas, Celulitis bacteriana de las crestas y barbillas; y otras enfermedades septicémicas. Finalmente los cuadros bajamente patógenos pueden ser confundidos con otras enfermedades frecuentes, por los signos entéricos o respiratorios (*op. cit.*).

En laboratorio la infección debe diferenciarse con los adenovirus aviares, las cepas velogénicas de ENC y otros paramixovirus mediante la prueba de AGID y el uso de antisueros a virus de Influenza tipo A (OIE, 2008). Además debe considerarse otros agentes como el Síndrome de Cabeza Hinchada, *Mycoplasma galisepticum*, Bronquitis

Infecciosa, Clamidiasis y otras bacterias (Swayne *et al.*, 1998); asimismo para diferenciarlos son útiles los antisueros específicos para neutralizar otros virus y antibióticos en las muestras de tejidos o hisopados para eliminar las bacterias (*op. cit.*)

Finalmente se debe sospechar de la IAAP en cualquier brote de enfermedad de aves de corral con mortalidad que persista a pesar de la aplicación de medidas preventivas y terapéuticas, o cuando el contexto epidemiológico sugiere claramente el ingreso de la infección (Martin *et al.*, 2007).

2.12 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Inicialmente Alexander *et al.*, (1981) reportó que puede aislarse más de un agente en combinación con los virus e inclusive varios subtipos en patos afectados por problemas respiratorios en condiciones naturales, favoreciendo la diseminación de los virus a otras especies domésticas y silvestres hasta humanos. Adicionalmente la OIE, menciona que algunas pruebas pueden subestimar la prevalencia de las infecciones por H5N1 en aves silvestres.

Existen varias alternativas, sin embargo es necesario que las pruebas se complementen para un diagnóstico seguro (Senne, 1998; Swayne *et al.*, 1998; Spackman *et al.*, 2008). Según la OIE, (2009) las técnicas comprenden; aislamiento viral, identificación del agente, fijación de la patogenicidad, pruebas serológicas, y técnicas moleculares o de captura de antígeno; asimismo se recomienda que las pruebas de detección de antígeno deban ser utilizadas para identificar el virus solo en parvadas y no en individuos (Cuadro 09)

Cuadro 09. Características de las pruebas de diagnóstico selectas para los VIA

Prueba	Blanco	Sensibilidad relativa	Especificidad relativa	Costo relativo por muestra	Tiempo de resultado
Aislamiento viral	Virus viable	Muy alta	Moderada	Alta	1 a 2 semanas
Detección de antígeno	Proteína de VIA	Baja	Alta	Moderada	15 minutos
Immunoensayos (kits comerciales)	ARN VIA	Muy alta	Muy alta	Moderada	3 horas
RT- PCR en tiempo real	1).- Nucleoproteínas y proteínas de la matriz de Influenzavirus tipo A.	Moderada	Alta	Moderada	48 horas
Agar Gel inmunodifusión	2).- Anticuerpos contra la nucleoproteína y proteínas de la matriz de virus de Influenza tipo A.				
ELISA (kit comercial)	Anticuerpo a virus de Influenza tipo A	Moderada	Moderada	Baja	2 a 3 horas
Inhibición de la Hemaglutinación	1).- Identificación de subtipo de H.	Alta	Moderada a alta	Moderada a alta	2 horas
	2).- Anticuerpo a subtipo específico de H.				
Inhibición de la Neuraminidasa	1).- Identificación de subtipo de N.	Moderada	Moderada a alta	Moderada	3 horas
	2).- Anticuerpo a subtipo específico de N.				

Spackman *et al.*, 2008

2.12.1 Aislamiento viral e identificación del agente

El aislamiento viral es considerado un requisito mínimo para el diagnóstico definitivo de la enfermedad, y se realiza mediante el procesamiento de muestras provenientes de hisopado cloacal, traqueal o de otros tejidos (FAO, 2007b). Para el diagnóstico definitivo de la presencia viral en patos se aplica el hisopado cloacal (*op. cit.*)

Los métodos de aislamiento e identificación viral fueron descritos detalladamente por Woolcock *et al.*, (2001) y Swayne y Halvorson, (2003). Para identificar el agente, las muestras pueden proceder de aves muertas e incluyen contenido intestinal (heces), hisopados cloacales u oro faríngeos; asimismo las muestras de tráquea, pulmones, sacos aéreos, intestinos, bazo, riñones, cerebro, hígado y corazón deberían ser colectadas separadamente o en pooles. Por otra parte si las muestras son tomadas de aves vivas deben incluir hisopados cloacales y oro faríngeos (Senne, 1998).

La detección de la actividad hemaglutinante en el fluido alantoideo después de la inoculación en huevos embrionados, se realiza mediante la prueba de HA e indica una alta probabilidad de la presencia de VIA tipo A o Paramixovirus aviares, y si los fluidos resultan negativos deben ser inoculados nuevamente (FAO, 2007a). Ante una HA positiva del fluido alantoideo, existen varias técnicas que permiten confirmar la presencia de virus de Influenza A, entre ellas; AGID, ELISA o las técnicas moleculares (Sánchez *et al.*, 2007). Adicionalmente existen otros métodos como la ultracentrifugación o la precipitación bajo condiciones ácidas para preparar y concentrar el virus del fluido alantoideo o la membrana corioalantoidea (Swayne *et al.*, 1998).

La prueba definitiva para el diagnóstico de la infección por VIA es el uso de antisuero específico preparado en animales que producen un mínimo de reacciones no específicas (por ejemplo: cabras) dirigidos contra los subtipos H y N del virus (OIE, 2009). Las pruebas de ELISA para captura de antígeno; o pruebas específicas IH ó IN para Influenza tipo A también pueden ser usadas para la identificación viral (Swayne *et al.*, 1998).

La presencia de VIA en muestras biológicas o ambientales con fines de screening rápido también pueden detectarse mediante una serie de técnicas eficaces con sensibilidad y factibilidad variables entre ellas se menciona a la inmunofluorescencia directa en cortes de tejidos, los ELISA para detección de antígeno, y los «pen-site test» o pruebas factibles «a pie de granja» mediante kits fácilmente transportables, basados en técnicas inmunoenzimáticas o inmunocromatográficas (FAO, 2007a; Sánchez *et al.*, 2007).

La PCR es el procedimiento tamiz más sensible para detección viral; y su sensibilidad puede llegar de un 96 a 97% comparado con el aislamiento viral; sin embargo esta prueba debe realizarse bajo condiciones especiales y validarse (Swayne y Halvorson, 2003; Com. Europ Communities, 2006). Según Catolli *et al.*, (2004) los métodos basados en PCR son los de más alta sensibilidad comparado con la Elisa de captura de antígeno (EIA) para la detección de virus en infecciones de campo y experimentales. Por otra parte algunos investigadores como Suárez *et al.*, (2007); Spackman *et al.*, (2008) y Dormitorio *et al.*, (2009) aplicaron favorablemente la RT-PCR, sin embargo el uso de controles eficientes y confiables, y la falta de sensibilidad apropiada en muestras de campo son las limitantes para su aplicación.

La RT-PCR ó RT-PCR tr, usa una nucleoproteína específica o cebador conservado específico para las nucleoproteínas o la matriz (Rose *et al.*, 2007). También se ha demostrado la presencia de subtipos virales H5 ó H7 usando cebadores específicos (Bragstad *et al.*, 2005). Por otra parte Agüero *et al.*, (2006b) ha descrito una RT-PCR dirigida a la identificación directa de la neuraminidasa N1 en muy poco tiempo (aprox. dos horas). Finalmente Yamamoto *et al.*, (2008) reportó que los virus también pueden detectarse en plumas de patos domésticos; mediante pruebas inmunohistoquímicas y de RT-PCR.

Finalmente para el diagnóstico también se ha aplicado la tipificación antigénica usando anticuerpos monoclonales o policlonales (Swayne y Halvorson, 2003); y la genotipificación usando análisis de secuenciación de genes H y N; asimismo la prueba de cultivo celular para detectar los virus altamente patógenos (OIE, 2009).

2.12.2 Cálculo de la patogenicidad

Es un método para el cálculo de la virulencia que permite la clasificación de los virus de acuerdo a sus características en laboratorio. La OIE y la UE, adoptaron el criterio para clasificar los VIAAP basados en su patogenicidad en pollos, el crecimiento en cultivo celular, y la secuencia de aminoácidos del péptido enlazado. Los criterios para evaluar la patogenicidad de los VIAAP son definidos de la siguiente manera:

- 1.- Virus que tiene un IPIV mayor a 1.2; ó mata 6,7 u 8 pollos susceptibles de 4 a 8 semanas de edad, dentro de los 10 días post inoculación intravenosa, con 0.2 ml. de una dilución de 1/10 de fluido alantoideo infectivo.
- 2.- Virus del subtipo H5 ó H7 que no reúne los criterios del ítem 1, pero tiene una secuencia de aminoácidos en el sitio de corte de la H, compatible con los virus altamente patógenos.
- 3.- Virus que no es de subtipo H5 ó H7, pero que mata de 1 a 5 pollos y crece en cultivo celular en ausencia de tripsina.

Según la OIE, los aislados altamente patógenos H5 ó H7, se han obtenido por secuencia de sus genomas, o por su patogenicidad asociada con cambios en el lugar de partición de la H; esto incluye:

- 1.- Sustitución de aminoácidos ácidos con básicos (arginina o lisina)
- 2.- Inserción de aminoácidos básicos múltiples de codones duplicados del sitio de partición de la H.
- 3.- Inserción corta de aminoácidos básicos y no básicos de una fuente no conocida.
- 4.- Recombinación con insertos de otros segmentos génicos que alargan el sitio de ruptura de la H.
- 5.- Pérdida del sitio de resguardo de glicosilación en el residuo 13, en combinación con múltiples aminoácidos básicos en el sitio de partición.

En la actualidad todos los aislados altamente patógenos han tenido los subtipos H5 o H7; y al menos 2 aislados, ambos del subtipo H10 (H10N4 y H10N5) han sido reportados como virus altamente patogénicos (Wood *et al.*, 1996); sin embargo no produjeron muerte en pollos cuando fueron inoculados intranasalmente, y no tuvieron múltiples aminoácidos básicos como sitio de partición de su H (*op. cit.*). Otros virus bajamente patógenos fueron nefrotrópicos, y los pollos que murieron tuvieron altos títulos virales en riñones indicando un mecanismo patogénico renal (Slemons y Swayne, 1990). Finalmente Londt *et al.*, (2007) encontraron que otros aislados tuvieron sitios de partición con múltiples aminoácidos básicos, pero mostraron baja virulencia.

2.12.3 Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas miden a gran escala el estado de la infección en la población para un diagnóstico temprano de la enfermedad. Los anticuerpos específicos pueden detectarse desde los siete días después de la infección (Buscaglia, 2004). Por otra parte la OIE, menciona que las pruebas de AGID y ELISA, son consideradas pruebas básicas para el diagnóstico inicial de la infección, las pruebas de IH e IN son complementarias y son usadas para sub tipificar los virus (Swayne *et al.*, 1998). También se menciona a la Inmunofluorescencia indirecta.

a).- Agar Gel Inmunodifusión (AGID)

Es una prueba estándar internacional de vigilancia para el diagnóstico serológico de los virus tanto altamente o bajamente patogénicos (Alexander, 2007a). Según Swayne *et al.*, (1998) se aplica en todas las especies de aves y confirmaría la presencia o ausencia de anticuerpos por infección viral; sin embargo la OIE, menciona que la respuesta de anticuerpos a la infección es generalmente pobre en aves silvestres; y es más apropiada para monitorear pollos y pavos; no obstante USAHA, (2008) menciona que los anticuerpos en AGID pueden ser detectados de 5 a 7 días en algunas aves y a los 10 días en todas, por esto Capua y

Alexander, (2005) sugieren que en patos domésticos el aislamiento viral confirme definitivamente los resultados con procesamiento de muestras de hisopado cloacal.

El antígeno control empleado para esta prueba es preparado de la membrana corioalantoidea de huevos embrionados de pollos de 10 días de edad infectados, el cual es procesado e inactivado (Swayne *et al.*, 1998).

b).- Hemaglutinación (HA) Inhibición de la Hemaglutinación (IH) e Inhibición de la Neuraminidasa (IN).

La prueba de HA permite identificar la actividad hemaglutinante del virus en una muestra sospechosa, y la titulación de antígeno viral para realizar la prueba de IH. Por otra parte la prueba de IH permite la detección de anticuerpos en el suero y la subtipificación de las hemaglutininas virales, pero es recomendable usarla después que las muestras son positivas a la prueba de AGID (Villegas, 1998).

Según la OIE, la IH es una prueba alternativa para el comercio internacional; y es la más apropiada en los laboratorios de referencia donde se necesita tratar el suero para descartar reacciones no específicas (Swayne *et al.*, 1998). Esta prueba es sensible y específica cuando se usa el antígeno apropiado; y puede usarse para monitorear la respuesta a la vacunación y a la infección (por ejemplo: con virus alta y bajamente patógeno en patos) (FAO, 2007a).

La prueba de IN también es usada para subtipificar los virus y caracterizar los anticuerpos a la neuraminidasa en aves infectadas y fue aplicada como parte de una estrategia DIVA en Italia (Capua *et al.*, 2003).

c).- Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Esta prueba puede detectar anticuerpos en el hospedero contra las proteínas virales de la nucleocápside (RNP y M) (Swayne *et al.*, 1998). Las ventajas de esta prueba es que puede ser empleada para procesar gran cantidad de muestras en forma automática, sin embargo los resultados deben ser interpretados en muestras de lotes y no en forma individual; también se pueden validar kits comerciales para propósitos específicos (OIE, 2009).

Los inmunoensayos enzimáticos de captura de antígeno con aislamiento de VIA en muestras de campo, muestran que la especificidad relativa de EIA-AC fue 100% y la sensibilidad relativa fue 79%, sugiriendo que la EIA-AC seria un apropiado adjunto a las pruebas estándar de diagnóstico (Davison *et al.*, 1992). Según la FAO, esta prueba puede detectar anticuerpos por infección en patos; sin embargo su uso en esta especie es limitada, asimismo en especies silvestres. Los resultados positivos en esta prueba deben ser corroborados con las pruebas de AGID ó IH para confirmar la infección (Swayne *et al.*, 1998).

Se ha aplicado la Elisa de bloqueo de Ac para VIABP y VIAAP en varias especies aviarias, representando 5 órdenes aviarias y 7 géneros; sin embargo se necesitan estudios adicionales para evaluar su utilidad con aves naturalmente infectadas (Brown *et al.*, 2009). No obstante se han evaluado pruebas de Elisa indirecta que permiten detectar bajos títulos de anticuerpos en aves silvestres eficientemente (Brown *et al.*, 2010).

2.12.4 Captura de antígeno y técnicas moleculares

Dentro de las pruebas de captura de antígeno se mencionan a la ELISA de captura, los inmunoensayos, y el uso de anticuerpos monoclonales contra nucleoproteínas; asimismo se pueden usar los kits para detección viral pero tienen baja sensibilidad y alto costo (OIE, 2009). Por otra parte la mayoría de estas pruebas son aplicables para detectar virus en aves clínicamente enfermas o muertas (Hoong Chua *et al.*, 2007).

Entre las técnicas moleculares se menciona a la detección de ARN directo mediante pruebas de RT-PCR para identificación de subtipos (al menos H5 y H7) (FAO, 2006); también el uso de RT-PCR en tiempo real que tuvo una sensibilidad y especificidad equivalente al aislamiento viral en muestras de hisopados traqueales en pollos y pavos bajo ciertas condiciones; sin embargo carece de sensibilidad en hisopados cloacales debido a la presencia de inhibidores de PCR que producen falsos negativos (Das *et al.*, 2006); no obstante Van Borm *et al.*, (2007) usó controles positivos internos y eliminó inhibidores de PCR en las muestras mediante mejoramiento del método de extracción de ARN, llegando a mejores resultados.

Las técnicas moleculares predicen los patotipos y pueden obtenerse resultados en menos de 3 días (Suarez, 1998); además facilitan el diagnóstico diferencial simultáneo con la enfermedad de Newcastle (Soares *et al.*, 2006); no obstante el problema con las pruebas moleculares radica en que los métodos y protocolos pueden ser desarrollados y reportados; pero faltan validarlos (OIE, 2009).

Últimamente se han aplicado modificaciones de la RT PCR para reducir el tiempo de identificación y secuenciación. El RT-PCR en tiempo real con iniciador y sonda de hidrólisis fluorogénica se ha usado para detectar virus de subtipos H5 o H7 (Alexander, 2007b). Otro RT-PCR es la prueba de hidrólisis ó método Taq Man, que genera una señal fluorescente blanca específica y detección viral directa (genes de la Matriz), que es altamente conservada en todos los tipos de VIA, en especímenes clínicos con cebadores blancos para la región H2 (de la H) bien conservada dentro de los genes de hemaglutinina de los subtipos H5 y H7 (Spackman *et al.*, 2002).

Un método de inactivación viral con desinfectante fenólico que inactiva el virus mientras preserva el ARN por al menos 8 semanas a -70°C, fue usado como un accesible pro eficiente multicentro para una prueba de RT-PCR para Influenza tipo A, con variaciones mínimas (CV=5.19%), e identificación de muestras altamente exacta (96.7% identificación correcta) con respecto a la instrumentación de PCR tr (Spackman y Suarez, 2005).

Finalmente Lang *et al.*, (2008) aplicaron el RT PCR para detectar virus en sedimentos de charcos poblados por aves acuáticas. La proporción de detección fue más del 50%. También detecto subtipos que estaban presentes en aves en la misma región geográfica. Los virus fueron detectados en invierno cuando los charcos fueron congelados, aunque no se mostró que los virus eran viables. Esta metodología puede ser útil para determinar la prevalencia en la diversidad de los virus presentes en el ambiente y son válidos para entender la ecología de los virus de influenza (*op. cit.*).

2.13 PREVENCIÓN, BIOSEGURIDAD Y CONTROL

El impacto y la epidemiología de IA varían de acuerdo a las regiones del mundo, por tanto es imposible formular recomendaciones que consideren todas las situaciones posibles. La prevención es la mejor política contra la IA y la erradicación es la meta en el caso de la H5 y H7 (OIE, 2003). No obstante las estrategias de prevención y control, varían por regulaciones de gobierno y sus instituciones, estableciendo un protocolo de bioseguridad particular (Kelly *et al.*, 2008); en países libres y no libres de la enfermedad (OIE, 2009). Por el contrario según la OMS las precauciones en salud pública deben ser reglamentadas igualmente frente a casos humanos relacionados con la IA y su empleo es imperativo por el riesgo de conllevar a pandemias mundiales.

2.13.1 Prevención

Según la FAO (2007e) y OIE (2008) las estrategias de prevención comprometen 2 aspectos:

- Una vigilancia y control externo (cuarentena externa) que involucra realizar;
 - Reportes de la ocurrencia de brotes en el mundo.
 - Requisitos zoosanitarios.
 - Diagnóstico de laboratorio.
 - Cierre de fronteras.
 - Análisis de riesgo.
- Una vigilancia y control interno, que involucra realizar;
 - Notificación de casos sospechosos.
 - Inspección de granjas.
 - Muestreo periódico.
 - Diagnóstico de laboratorio.

- Control de tránsito.
- Bioseguridad.
- Análisis de riesgo.

En esa línea las medidas de prevención en aves de corral pueden considerar:

- En zonas libres con riesgo de infección;
 - El manejo de la parvada todo adentro/todo afuera, previniendo cualquier contacto con aves silvestres o sus fuentes de agua.
 - Evitar la devolución de las aves de granja a los mercados de aves vivas u otros mataderos.
 - Evitar la introducción en las explotaciones de aves cuya situación sanitaria se desconoce.
 - Implementar estricta higiene y bioseguridad para prevenir la transmisión del virus en fómites.
- En zonas con presencia de brotes;
 - Rápida despoblación de las parvadas infectadas y expuestas.
 - Eliminación adecuada de las carcasas y materiales contaminados.
 - Aplicar estrictas medidas de bioseguridad.
 - Aplicar cuarentenas en granjas.
 - Establecer controles de movimiento.
 - Realizar la vigilancia epidemiológica.
 - Implementar la vacunación.

La prevención también compromete la Salud Pública, por tal motivo la FAO y la OMS describen una serie de puntos a ser considerados en el manejo de alimentos, métodos de crianza, y comercialización de productos de origen animal (especialmente aviar) (CENAVECE). Adicionalmente la prevención de IAAP considera precauciones sanitarias en la población humana, sugiriendo evitar la crianza y mercadeo de aves vivas en zonas donde el virus H5N1 podría estar presente (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009).

La Prevención en el caso de la IAAP en aves silvestres es importante tanto en países endémicos, países vecinos ó en países con riesgo de infección (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009). Más aún ningún país miembro puede declarar libre de IA sus poblaciones de aves silvestres (Gaceta Sanitaria, 2009). En este sentido se deben desarrollar las siguientes actividades:

- Observación de las aves silvestres desde cierta distancia, realizando monitoreos de vigilancia.
- Reportar las aves silvestres muertas o enfermas a los organismos de recursos naturales estatales, tribales o federales.

- Adopción de medidas higiénicas pertinentes por parte de los cazadores que tengan contacto con las aves.

La destrucción o modificación sustancial de hábitats como humedales y otros ecosistemas con el objetivo de reducir el contacto entre las aves domésticas y las aves silvestres es inviable, debido a su uso racional ya definido (INFOSAN, 2005); además puede agravar el problema provocando una mayor dispersión de las aves silvestres infectadas, facilitando el contacto más estrecho entre estas y los animales domésticos (Convención sobre las especies migratorias, 2008), contribuyendo a la degradación ambiental, reduciendo la biodiversidad (Health Day, 2008). Por otra parte ya no se considera aceptable la lucha contra las enfermedades y su erradicación mediante la aplicación de un sacrificio masivo de los animales como medida principal por razones éticas, ecológicas y económicas (OIE, 2005).

La implementación de sistemas agrícolas más sostenibles y menos intensivos de crianza de aves de corral, podrían ser más bioseguros disminuyendo el contacto con las aves acuáticas silvestres con menos posibilidad de infecciones cruzadas por los virus y su amplificación patogénica (Gregor, 2006); favoreciendo la seguridad en la salud animal y pública; sin embargo estos criterios son desafíos en materia política - económica (*op. cit.*).

2.13.2 Bioseguridad

Es una medida básica de prevención dirigida a evitar la introducción de la infección y su diseminación. El objetivo es evitar de alguna manera el contacto entre los animales y el agente causal (Wetlands International Globalsite, 2007). Según Buscaglia (2004) esta práctica es la llave en la prevención y control; asimismo Martin *et al.*, (2007) mencionó que en el caso de la IAAP la bioseguridad va unida a la prevención en toda área de riesgo comprometida.

Las prácticas de bioseguridad pueden ser más dificultosas en lugares donde existen aves silvestres o patos criados en arrozales como ocurre en algunos países asiáticos; en estos casos es mejor no criar aves para fines comerciales en lugares cercanos (Wetlands International Globalsite, 2007). No obstante con este sistema de crianza Tailandia logró mantener granjas libres sólo estableciendo estrictas medidas de bioseguridad (Sims, 2007).

Algunas referencias entre ellas; Martin *et al.*, (2007); Wetlands International, Globalsite (2007) y NABC - Kansas University (2009) mencionan que las principales medidas de bioseguridad en lugares con brotes pueden ser:

- Proteger la avicultura comercial mediante prevención del contacto de aves de libre vuelo y sus heces o fuentes de agua que pueden haber estado contaminadas con aves silvestres.

- Evitar comercializar aves vivas en mercados y educar acerca del peligro que poseen estos mercados.
- Remover todo material orgánico y limpiar completamente las distintas superficies de los lugares, equipos y áreas de crianza periódicamente.
- Prevenir el contacto entre nuevas aves infectadas y aves susceptibles.
- Evitar el uso de las mismas fuentes de agua o fuentes de alimento entre aves domésticas y aves silvestres.
- Controlar el tráfico entre aves infectadas y aves no infectadas.
- Evitar el contacto de los patos y otras aves migratorias residentes temporales y las aguas estancadas donde hallan permanecido.
- Mantener las aves domésticas en lo posible encerradas con los debidos controles de higiene.
- Manejar lotes con el sistema “todo adentro, todo afuera” para prevenir la difusión del virus de un lote a otro.
- Aplicar la cuarentena en granjas, y establecer controles de movimiento y vigilancia.
- Regular el manejo de residuos de crianza (aves muertas, estiércol, alimento residual, etc.)
- Realizar limpieza de equipos utilizados en la crianza con desinfección eficaz y descanso antes de su nuevo uso.
- Evitar la presencia de otras especies de animales como perros o gatos conjuntamente con las zonas de crianza de aves.
- Reportar los signos tempranos de un problema que puede ser devastador.
- Aplicar la vacunación de acuerdo a las condiciones de riesgo y diseminación de la enfermedad.

2.13.3 Control y erradicación

2.13.3.1 Control

No existe una estrategia efectiva predeterminada para controlar los brotes de IA. Los países deben tener un plan de acción completo y los recursos humanos - financieros para implementarlo bajo sus condiciones vigentes (García *et al.*, 2006). Un enfoque regional también es necesario (CUCBA, 2005).

La FAO y OIE, mencionan que los esfuerzos para controlar la IAAP en aves domésticas deberían focalizarse en una rápida respuesta frente a los brotes de la enfermedad, disminuir la carga viral en aves infectadas, prevenir la exposición de la enfermedad en granjas; y prevenir la exposición de aves silvestres a las granjas potencialmente infectadas.

Las estrategias de control deben contener la enfermedad antes que se disemine, eliminarla mediante el sacrificio apropiado de las parvadas afectadas (Martin *et al.*, 2007).

Sólo si esto fracasa deberán considerarse otras medidas como la vacunación; como sucedió en la epidemia en México en 1992, que progresó a brotes fatales de alta patogenicidad en 1995 por un control inadecuado de la enfermedad (Espinal, 2007).

Según la OIE, las estrategias de control y erradicación comprenden:

- a) Un sistema de emergencia ó plan de contingencia
- b) Cuarentena y profilaxis sanitaria
- c) Diagnóstico de laboratorio
- d) Control de tránsito o de movimiento
- e) Sacrificio de animales afectados
- f) Vacunación estratégica

Por otra parte se han propuesto programas alternativos al control de brotes de IA en aves comerciales que involucran a no sacrificar aves sanas comprometidas en los focos cercanos a los brotes sin disposiciones éticas, esto no requiere disposición económica, es efectiva en costo e incluye más a los productores con aves infectadas (Halvorson *et al.*, 2003); sin embargo considera rígidas medidas de bioseguridad, procesamiento de productos de aves, vacunación, repoblación de áreas y costos (*op. cit.*)

a).- Sistema de emergencia o Plan de contingencia

Según la FAO, OIE y OMS, debe considerarse un diagnóstico temprano de cualquier infección, para tomar decisiones zoonosanitarias adecuadas previamente planeadas en diferentes escenarios, con recursos económicos y humanos para hacer frente a la contingencia. Por otra parte estos deben considerar ejercicios de simulación que son claves, para identificar vacíos en o sobre posición de las responsabilidades durante un brote (Martin *et al.*, 2007).

Según Martin *et al.*, (2007) el plan debería contener los siguientes apartados:

Fase de Preparación.

- Evaluación de los servicios veterinarios oficiales para responder a emergencias en salud animal.
- Preparar o revisar el Plan Nacional para la Prevención, Control y Erradicación de IA.
- Contar con los ordenamientos legales y políticos para la implementación del Plan.
- Establecer legislativamente el reporte obligatorio de casos sospechosos y casos confirmados de IA.
- Contar con un sistema de seguimiento de casos sospechosos y confirmados.
- Concertar los recursos económicos y asegurar su mecanismo de gestión para llevar a cabo las acciones contenidas en el Plan.

- Promover la participación de la industria para alcanzar los objetivos del Plan.
- Coordinar con los servicios de salud para llevar a cabo las acciones de su competencia contenidas en este Plan y en el Plan de Preparación para la Pandemia promovidos por la OMS.

Análisis de riesgo.

- Realizar un análisis de riesgo de introducción de IA.
- Realizar un análisis de riesgo de su diseminación en las granjas.
- Establecer un plan de regionalización y compartimentación de la avicultura, con base en el registro de granjas y explotaciones avícolas y en acuerdo con la industria.

Laboratorio de diagnóstico.

- Fortalecer la infraestructura del Laboratorio central de diagnóstico y de laboratorios de apoyo estratégicos para llevar a cabo las actividades de vigilancia y diagnóstico de IA.

Vigilancia y monitoreo.

- Planear e implementar las actividades de vigilancia epidemiológica contenidas en el Plan.
- Determinar las zonas de descanso de aves migratorias.
- Determinar la ubicación de mercados de aves vivas y explotaciones de otras especies de aves comerciales.
- Establecer un sistema de registro de granjas y llevar a cabo un censo avícola que permita determinar la ubicación georeferenciada de granjas avícolas, y su función zootécnica.
- Determinar las granjas que reciben aves y huevos fértiles de importación.
- Contar con una guía técnica de monitoreo en granjas comerciales.

Bioseguridad.

- Contar con un manual de bioseguridad para granjas avícolas.
- Tener un sistema de capacitación y difusión de estas medidas.
- Contar con un sistema de calificación de bioseguridad de granjas y centros de comercialización de aves.

Control.

- Establecer las actividades de control y erradicación contenidas en este Plan.

Vacunación.

- De acuerdo a las directrices internacionales y bajo los lineamientos establecidos deberán llevar a cabo el registro de vacunas contra IA que se consideren convenientes.
- Establecer acuerdos con los laboratorios productores de vacuna reconocidos para garantizar el abasto en caso de emergencia.
- Contar con un banco de vacunas.

- Determinar las condiciones de utilización de las vacunas.

Indemnización.

- Establecer un reglamento para la compensación a productores por el sacrificio de aves de acuerdo a las recomendaciones contenidas en este Plan.

Comunicación.

- Contar con un sistema de comunicación oficial y social para brindar información objetiva a los medios de comunicación y público en general sobre la situación de la enfermedad.
- Elaborar carteles, trípticos y materiales de difusión para la prevención y control de la enfermedad.
- Contar con un sistema de comunicación en red para informar la situación de la enfermedad.

b).- Cuarentena y profilaxis sanitaria

En la cuarentena se debe considerar un periodo de desabastecimiento (vacío sanitario) posterior al sacrificio hasta por lo menos 21 días después del control del brote y del término de la limpieza y desinfección (Swayne y Halvorson, 2003); finalmente la repoblación debe ser progresiva monitoreando a las aves diariamente para detectar probables signos de enfermedad y serológicamente para determinar si existe re-infección (OIE, 2008).

En la profilaxis, se pueden usar una variedad de detergentes y desinfectantes que destruyen los virus (Swayne y Halvorson, 2003); así como el entierro en abono y la elaboración de composta o incineración (Com. For. Anim. Diseases, 1998); igualmente la temperatura así como la radiación ionizante o los bajos niveles de pH (en promedio 2) (CFSPH/ IICAB / OIE, 2009) (Cuadro 10)

Cuadro 10. Condiciones físico - químicas de sobrevivencia e inactivación de los VIA

Condiciones	Sobrevivencia
Temperatura	Inactivación en huevo completo: 60° C/188 seg. Inactivación en clara de huevo deshidratada: 54.4°C / 21.38 días.
pH	Estable a pH de 5.5 - 8. Inactivación a pH ácido.
Desinfectantes	Inactivación en; fenol, amonio cuaternario, peróxido de hidrógeno, hipoclorito de sodio, formalina y compuestos de yodo.
Materia orgánica	Viable durante mucho tiempo en los tejidos, heces y agua (sobretudo en aguas superficiales en el campo). La sobrevivencia es por años en lagos. Infectividad retenida por más de 207 días a 17°C y 102 días a 28°C. En carne de res, pescado y otros productos alimenticios es variable pero mayor en condiciones de refrigeración.
Materia inorgánica	Instalaciones y corrales de crianza de aves es variable.

Stallknecht, 1998; Martin *et al.*, 2007; Stallknecht y Brown, 2007; Rose *et al.*, 2007; Whitworth *et al.*, 2007.

c).- Diagnóstico de laboratorio

Según García (2009) las pruebas serológicas establecidas en el capítulo de directrices de vigilancia de IA permitirá identificar anticuerpos contra la H, N, NSP, NP y M, teniendo disponible pruebas de AGID y ELISA de bloqueo y directa para determinar anticuerpos contra de proteínas de matriz y nucleoproteína, pruebas de IH e IN. También se encuentran disponibles pruebas de virus neutralización, pruebas para determinar la cantidad de anticuerpos contra proteínas no estructurales y DIVA para diferenciar aves vacunadas de infectadas.

Por otra parte la OIE recomienda que todas las parvadas positivas deban ser investigadas epidemiológicamente utilizando pruebas complementarias que deberán ser más específicas que las pruebas de escrutinio. El aislamiento viral o la detección del genoma viral, por métodos moleculares, son pruebas de vigilancia complementarias (García, 2009). Finalmente el país, zona o compartimiento deberán tener validadas las pruebas utilizadas y detallar con la información correspondiente (*op. cit.*).

De acuerdo a la OIE hasta el 2009 el diagnóstico comprende estrictamente los siguientes procedimientos;

- La identificación del agente, mediante inoculación de huevos embrionados de gallina de 9-11 días de edad, seguida por la demostración de la hemaglutinación, la prueba de inmunodifusión para confirmar la presencia del virus de Influenza tipo A, la determinación del subtipo con antiseros mono específicos y la evaluación de la virulencia de la cepa (evaluación del índice de patogenicidad intravenoso en gallinas de 4-8 semanas de edad)
- Las pruebas serológicas; son la HA, la IH y la AGID.

La toma de muestras consistirá en torundas de tráquea y cloaca (o heces) de aves vivas o de distintos órganos y heces de aves muertas para la identificación del agente y las muestras de sangre coagulada o suero para la detección de anticuerpos.

d).- Control de tránsito o movimientos

Esta medida se complementa con la delimitación de un área de control y un área restringida donde se realiza una vigilancia intensiva y control de movimientos (Martin *et al.*, 2007). El área de control es más extenso y se encuentra rodeado de una o varias áreas restringidas (probablemente una provincia) donde las restricciones en el tránsito de otros animales, personas, vehículos y todo probable vector reducirán el riesgo de diseminación de la enfermedad desde las áreas de riesgo de acuerdo a lo necesario (OIE, 2008).

e).- Sacrificio de animales afectados

En los focos de enfermedad es necesario sacrificar a todas las aves, eliminar los canales y todos sus productos (Comotto, 2000). La eliminación apropiada de cadáveres, aplicando normas de limpieza y desinfección de los equipos y construcciones, y otra área de confinamiento del área infectada; asimismo el personal encargado debe tomar las precauciones en las operaciones descritas (OIE, 2008).

Las técnicas de sacrificio de las aves pueden ser; la dislocación del cuello cuando es individual ó gasificación con dióxido de carbono cuando es en grupo; por otra parte la eliminación de los cadáveres puede ser mediante entierro, cremación e incineración, ó elaboración de composta cuando existe el riesgo de contaminación de acuíferos con el entierro ó dispersión del virus con el transporte de los cadáveres (Martin *et al.*, 2007).

f).- Vacunación estratégica

Es considerada una estrategia para detener la enfermedad. Se aplica cuando la enfermedad ha superado todos los recursos de control, cuando el costo por sacrificio no puede ser asumido, si la enfermedad está en etapas tempranas y no se podrá frenar (FAO 2006a; FAO-Inforural, 2006; Martin *et al.*, 2007). Su propósito es proteger a la población de aves para disminuir la susceptibilidad a la infección y reducir la expulsión viral (Linzito *et al.*, 2005); para no contaminar el ambiente e infectar a otras especies, reduciendo el riesgo ocupacional que enfrentan los trabajadores de la industria avícola (Malo, 2006)

La vacunación puede ser usada como herramienta de apoyo en los programas de erradicación, en combinación con otros métodos de control (Capua y Marangon, 2006b; OIE/FAO/IZSVE, y UE 2007); sin embargo sigue siendo prohibida en la mayoría de países debido a su interferencia con las políticas de estas medidas contra la enfermedad, las pruebas de vigilancia y su impacto negativo en el comercio de aves (OIE, 2009). Asimismo las vacunas vivas convencionales contra algún subtipo específico de IA no son recomendables (*op. cit.*).

La eficacia de la vacunación se mide de acuerdo a la protección contra los signos clínicos, disminución de la mortalidad, y aumento de la dosis infecciosa mínima requerida (Suarez, 2005; Peyre *et al.*, 2009). Según la OIE, (2005) las vacunas son seguras y eficaces si se usan apropiadamente, y pueden ayudar a mejorar la salud animal, mantener la biodiversidad y proteger a los consumidores de productos de origen animal.

Por otra parte la OIE/FAO/IZSVE, y UE (2007) menciona que para implementar la vacunación es necesario analizar la situación existente en el país y su contexto general, su situación epidemiológica actual, el estatus de países vecinos, los riesgos, el conocimiento del

sistema de producción avícola; así como los requisitos logísticos necesarios que incluyen la estructura de los servicios veterinarios, disponibilidad de los recursos humanos, la posibilidad de instaurar restricciones y controles de movimientos para llevar a cabo una campaña eficaz.

Las vacunas usadas contra la IAN ó IABP, pueden ser:

- **Vacunas convencionales inactivadas**, que contienen virus entero y han sido preparadas de fluido alantoideo infectivo inactivado con betapropiolactona o formalina, y emulsificado con aceite mineral (Peyre *et al.*, 2009); estas pueden ser *monovalentes* conteniendo cepas H5 ó H7, o *bivalentes* conteniendo ambas cepas (OIE/FAO/IZSVe, y UE, 2007). Por otra parte las vacunas pueden ser *homólogas* si tienen aislados epidémicos o cepas virales Standard que poseen los mismos subtipos H y N de los virus de campo circulantes, ó *heterólogas* si tienen el mismo subtipo de H del virus de campo, pero diferente N (OIE, 2009).
- **Vacunas recombinantes**, producidas por inserción de genes que codifican las proteínas hemaglutininas en un vector del virus usando este virus recombinado para inmunizar a las aves contra IA (Swayne, 2004) dentro de estas se encuentran; la vacuna de Poxvirus aviar, la vacuna H5N1 basada en tecnología de Genética Reversa, y la vacuna de IA con la Cepa de Newcastle (Peyre *et al.*, 2009).

Capua y Marangon, (2006b) y Bruschke *et al.*, (2007) mencionan que las estrategias de vacunación varían de acuerdo al nivel de infectividad de un país. Estas pueden ser:

- **La vacunación preventiva** que debería ser usada en un país libre, pero con alto riesgo de introducción de la enfermedad, donde todas las aves con alto riesgo deberían ser vacunadas.
- **La vacunación de emergencia** que debería ser aplicada durante un brote, donde todos los animales no afectados dentro de la zona de cuarentena de un brote deberían ser vacunados.
- **La vacunación profiláctica** que debería ser aplicada cuando la enfermedad ha llegado a ser endémica, donde las aves son vacunadas sistemáticamente contra el mismo subtipo de H del virus circulante en la industria, para obtener un nivel de protección mínimo dentro de una población en riesgo.

Por otra parte según la OIE/FAO/IZSVe, y UE (2007) la vacunación puede ser; **masiva**, cuando es de emergencia, preventiva o de rutina; **selectiva** cuando se aplica solo a determinadas categorías de aves; y **en anillo** cuando se aplica a una zona alrededor de un foco de infección y solo es pertinente en caso de vacunación de emergencia.

La estrategia DIVA permite diferenciar aves con desafío viral de campo de aves vacunadas (Suarez, 2005; Capua y Marangon, 2006b); y es un requisito para que se levanten

las barreras comerciales en algunos países con brotes (Malo, 2006); sin embargo a veces no se puede realizar una segura vigilancia epidemiológica, porque la infección viral persiste en ausencia de la enfermedad (Swayne y Halvorson, 2003); otras veces su aplicación no ofrece protección cruzada contra subtipos de H virales que puedan estar involucradas en una nueva infección viral.

Las **aves centinelas seronegativas no vacunadas**, permiten determinar la circulación de virus en poblaciones vacunadas (Capua y Marangon, 2006b); también determina la respuesta serológica de aves vacunadas ante la N viral de campo, cuando se han empleado vacunas heterólogas y se conocen los detalles relativos a otros VIA en circulación (Suarez, 2005). Otra medida sería el desarrollo de pruebas basadas en la detección de anticuerpos contra la proteína NS1 que es más intenso frente a la exposición de virus de campo (Capua y Marangon, 2006b) (Cuadro 11).

Cuadro 11. Ventajas y límites de las vacunas contra IA comúnmente permitidas en el mercado contra los criterios de una vacuna ideal

Vacuna ideal	Homologa inactivada (Ej. H5N1)	Heteróloga Inactivada (Ej. H5N2)	Recombinante con Poxvirus (Ej. H5)	Recombinante (Ej. GR H5N1)	Recombinante IA/NC (Ej. H5/NC)
Pureza/seguridad/potencia	+/+/+	+/+/±	+/+/±	+/+/±	+/+/±
Termoestabilidad	No	No	No	No	Si/No*
Dosis simple	No (2-3 dosis)	No (2-3 dosis)	Si (una vez al año)	Si/No (2-3 dosis)	Si/No (cada 4 meses)
Facilidad de administración (oral/mucosa)	No: inyección	No: inyección	No: inyección	No: inyección	Si: gota ocular
DIVA	No	Si	Si	Si/No	Si
Costo	De 0.01 a 0.05 dólar por dosis (en 2007) el precio varia de acuerdo al país que elabora (vacunas Europeas son más caras que las vacunas Asiáticas)				

GR, Genética reversa; IA, Influenza Aviar; NC, Enfermedad de Newcastle; DIVA, Diferenciación de animales infectados de vacunados / * Dependiente de la cepa viral de Newcastle
Peyre *et al.*, 2009.

Cuando falla la vacunación, los virus puedan llegar a ser endémicos en las poblaciones vacunadas (Capua y Marangon, 2006b); pudiendo producirse cambios genéticos y antigénicos en el virus, tal como fue reportado en México por Tollis y Triani, (2002); esto posiblemente también ocurrió en China y otros países del Sud este Asiático (Peyre *et al.*, 2009), como Pakistán, en donde se observó reemergencia de la cepa H7N3 en el brote del 2004 (Capua y Marangon, 2006a).

La incompleta prevención de la excreción viral y la presión inmune de diferentes epítopes en la H, pueden ser responsables de la permanencia del virus de campo en

poblaciones vacunadas. Aunque no se han reportado brotes altamente patogénicos desde la implementación de la vacunación; continúan circulando los virus bajamente patogénicos (García, 2009). Por otra parte no hay un plan o estrategia nacional de evaluación de resultados con vacunación a excepción de Vietnam en donde el plan piloto no solo disminuyó el número de casos en granjas, sino que eliminó el número de casos en humanos (*op. cit.*) (Cuadro 12).

Según Marquéz 2007, debido a las características y circunstancias específicas especiales que enfrentaron en su momento, los países se vieron obligados a recurrir a la vacunación para el control y prevención de la enfermedad, promoviendo a que la IA haya tomado un carácter enzoótico; mientras que en otros países o regiones la IA es considerada aún como una enfermedad infecciosa exótica. Finalmente deben existir esfuerzos para establecer un intercambio de muestras de los virus para establecer un estándar internacional para vacunas y evitar los altos costos de control en el mundo, como en China y Tailandia, tomando en cuenta el riesgo que trae este problema en salud pública (Kida *et al.*, 2001; Webster y Hulse, 2005).

**Cuadro 12. Campañas de vacunación establecidas en países
contra Influenza Aviar**

Cepa vacunal	Brote viral por cepa	Estrategia de vacunación (periodo)	Resultado (último caso reportado)
País (fuente de vacuna)			
Rep. Pop. China (Instituto de Investigaciones Veterinario de Harbin; compañía local)			
H5N1 H5N2 Poxv. aviar H5	H5N1 (IAAP)	Profiláctica (2003 al presente)	No erradicada (Junio 2008)
Hong Kong (No bilis Influenza, Intervet; Vacunas Chinas, Instituto Veterinario Harbin)			
H5N2 H5N1	H5N1 (IAAP)	Emergencia Profiláctica Preventiva (2003 al presente)	Controlada Erradicada (2003)
Indonesia (Vaksindo más otros dos manufacturadores locales; Vacunas Chinas; Instituto Veterinario Harbin; Nobilis Influenza, Intervet; Gallimune, Merial)			
H5N1 H5N2 H5N9	H5N1 (IAAP)	Profiláctica (2003 al presente)	No erradicado (endémico)
Korea del Sur/Norte (Vaksindo, Indonesia; Avimex, México)			
H5N1 H5N2	H5N1 (IAAP)	Profiláctica (2005 al presente)	Erradicado (2005)
Vietnam (Vacunas Chinas, Inst. Vet. Harbin; Nobilis Influenza, Intervet; Gallimune flu, Merial)			
H5N1 H5N2 H5N9	H5N1 (IAAP)	Profiláctica (2005 al presente)	No erradicado (Junio del 2008)
México (Avimex; Nobilis influenza, Intervet; TROVAT, Merial)			
H5N2 Poxv. Aviar H5	H5N2 (IAAP) H5N2 (IABP)	Emergencia (1994) Profiláctica (1995 al presente)	IAAP Erradicada IABP No controlada (presente)
Italia ((Nobilis Influenza, Intervet; Bioflu, Merial)			
H7N3 H5/H7	H7N1 (IABP) H7N3 (IABP)	Emergencia (2000-2003) Profiláctica (2004) Preventiva (2004 - actualmente)	Erradicada (2004)
Pakistan (Nobilis Influenza, Intervet; Fluvac, Merial; producción local)			
H7N3* H7N3*† H9N2*† H7/H9*†	H7N3 (IAAP) H7N3 (IABP) H7N2 (IABP) H7N3 (IAAP)	Emergencia (2003-2004) Profiláctica (2004 al presente)	IAAP Erradicada IABP No controlada (presente)
USA (North Carolina, Ohio, Michigan, Illinois, Minesota, Missouri, Connecticut) (Lohman Animal Health; Fort Dodge)			
H1N1 H1N2 H7N3 H7N2 H7N3	H1N1 (IABP) H1N2 (IABP) H7N3 (IABP) H7N2 (IABP) H7N2 (IABP)	Profiláctica (1980-1997) Emergencia (1995, 2002, 2003)	Erradicada (2003)

* Vacuna basada en agua

† Vacuna basada en aceite

Peyre *et al.*, 2009

2.13.3.2 Erradicación

Es un método de eliminación de la enfermedad en lotes, granjas o zonas contaminadas. Según la FAO, su implementación requiere de un soporte financiero para que sea exitoso; además es difícil éticamente eliminar tantas aves presentes en granjas vecinas ó en focos geográficos de algún brote; sin embargo una vez presentado, este método es necesario y ofrece la seguridad de evitar la diseminación del virus a mediano y largo plazo (Malo, 2006). Finalmente según la OIE, la erradicación para la IAAP consiste en la eliminación de animales infectados y para la IABP son usados varios métodos como el control de mercadeos, vacunas y bioseguridad, etc.

La erradicación ha sido clave para controlar brotes de IAAP en EEUU, Chile y Australia (García, 2003; Gonzáles, 2006); sin embargo en Asia, los VIAAP H5N1 no han podido ser erradicados y actualmente son endémicos (Gaceta Sanitaria, 2009); dispersándose a otros mamíferos y personas con altas tasas de letalidad en Tailandia, Vietnam, China, Indonesia y Camboya (*op. cit.*).

Cuando no es posible erradicar la enfermedad a corto y mediano plazo, la OIE, FAO y la OMS, avalan la formación de compartimentos (ej., zona libre dentro del sector comercial donde las aves son confinadas y protegidas de la infección) o zona libre (considerando áreas geográficas definidas). En este caso la industria avícola debe asumir la responsabilidad de su propia bioseguridad (bio-exclusión) aunada a la supervisión veterinaria regulatoria en vigor; para la liberación de ciertas zonas. Además el sector comercial debe cumplir rigurosamente las restricciones nacionales para asegurar que la infección no ingrese a zonas libres, demostrando fidedignamente a sus socios comerciales el estatus de la zona en cualquier momento.

2.14 TRATAMIENTO

El tratamiento de la enfermedad en aves de corral es impráctica debido al costo de los fármacos que no resuelven muchas veces los casos clínicos, pudiendo generar resistencia y transmisión de los virus a otras aves; no es apropiado por el compromiso del problema en salud pública (Swayne y Halvorson, 2003; CFSPH/ IICAB / OIE, 2009).

2.15 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

Es un proceso que incluye la colección sistemática, análisis e interpretación de datos, así como una adecuada distribución de información para identificar y evaluar el curso de la enfermedad. Esto permite implementar acciones para su control, prevención y erradicación en países, regiones o compartimentos (FAO, 2007b).

La vigilancia epidemiológica debe ser implementada en aves de corral y en aves silvestres migratorias (García *et al.*, 2006; OIE, 2008); para prevenir la presentación de algún brote en la avicultura comercial y el control de futuras pandemias (Kida *et al.*, 2001). El objetivo básico es la detección temprana de la enfermedad en todas sus formas, para mantener la salud animal, salud pública, y la economía con base científica (Martin *et al.*, 2007).

Según García, (2009) un lugar libre de IA de declaración obligatoria debe contemplar:

- Que un país, zona o compartimento libre de IA, presente un programa de vigilancia en el que se demuestre la ausencia de infección viral y la presentación de IAAPDO o IABPDO durante los últimos 12 meses. En algunos casos se deberá adaptar la vigilancia en relación a factores históricos, geográficos, estructura del sector avícola, la población y la proximidad con focos recientes.
- En caso de infección viral y presentación de la IAAPDO; el país, zona o compartimento podrán recuperar su estatus de libre, tres meses después de haber aplicado las medidas de sacrificio sanitario y desinfección de las explotaciones afectadas y haber realizado una vigilancia de acuerdo a lo establecido por la OIE.
- En caso de infección viral y presentación de la IABPDO; el país, zona o compartimento podrán recuperar su estatus de libre, tres meses después de haber aplicado las medidas de sacrificio sanitario y eliminación total, desinfección de las explotaciones afectadas y haber realizado una vigilancia de acuerdo a lo establecido por la OIE.

Según la OIE, un programa de vigilancia debe centrarse en determinar el estatus de un país, zona o compartimento, que permita además vigilar a las poblaciones en riesgo, confirmar casos sospechosos, dar seguimiento a seropositivos, determinar si la seropositividad se debe a la vacuna ó infección, contando con métodos que permitan diferenciar entre aves vacunadas e infectadas. En el programa es importante determinar la frecuencia de contacto entre aves de corral y aves silvestres, evaluar los niveles de bioseguridad tanto en el país, región, compartimento y explotación, incluyendo a los sistemas de producción de aves acuáticas domésticas.

2.15.1 Objetivos

Según la OIE, los objetivos de vigilancia y monitoreo de la IAAP incluye:

- Detectar la enfermedad y la infección clínica.
- Comprender la epidemiología y ecología de la IA, así como su impacto socioeconómico a fin de apoyar el diseño de programas efectivos de control en los sistemas de producción avícola.
- Evaluar los patrones temporales y espaciales para fortalecer la efectividad de los esfuerzos en el control.

- Comprender la evolución de las variantes de VIA en Asia.
- Ayudar a definir y mitigar los riesgos para la salud pública.
- Monitorear los cambios antigénicos del virus mediante análisis frecuentes en laboratorios competentes.
- Mantener a través de la implementación de medidas apropiadas de control, el sustento y la seguridad alimentaria de la población.
- Demostrar que un país o compartimento se encuentran libre de la enfermedad clínica y que la infección está ausente, con el fin de facilitar el comercio internacional.
- Evaluar la eficacia de la vacunación, cuando esta es utilizada como parte de un programa de control bien estructurado.

2.15.2 Requisitos y consideraciones para la vigilancia de la enfermedad

Según la FAO, los requisitos mínimos para una vigilancia efectiva son:

- Una regulación legal para la notificación de la enfermedad.
- La existencia de un sistema formal para la detección e investigación de brotes de la enfermedad con identificación de los casos confirmados de acuerdo a las pautas de la OIE.
- Contar con la capacidad técnica para diagnosticar la IAAP e IABPN
- Tener un sistema para registrar, ordenar y analizar los datos de diagnóstico y vigilancia.
- Tener un sistema de vigilancia y diagnóstico regional, incluyendo al sector de salud pública, a la vez compartir la información para caracterizar los riesgos, prevenir la diseminación de la enfermedad y reforzar las medidas de control.
- Realizarse la vigilancia con una frecuencia mínima de cada seis meses o menos en zonas con riesgo a introducción de los virus.

Según la OIE, un programa de vigilancia debe considerar los siguientes aspectos:

- Un programa de vigilancia pasiva y activa.
- Demostrar que el programa es adecuado para detectar la presencia de infección.
- Una frecuencia de la vigilancia que dependerá de la situación epidemiológica del país, zona o compartimento.
- Un programa activo que debe ser aleatorio y específico, utilizando métodos virológicos, serológicos y clínicos.
- Un muestreo que debe tener un nivel aceptable, desde el punto de vista estadístico, con base en una estimación de prevalencia epidemiológica apropiada.
- Una determinación del nivel de sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico adoptadas, debidamente validadas.
- Una complementariedad en la vigilancia clínica que debe reforzarse con la notificación inmediata de casos sospechosos, basados en manifestaciones clínicas respiratorias,

decremento en el consumo de alimento y agua, aumento de mortalidad, descenso en la producción de huevo, asociado a una investigación con pruebas de laboratorio.

- Un soporte de pruebas de aislamiento y caracterización viral por métodos moleculares, que deberán ser enviados a los centros de referencia regional para determinar las características genéticas y antigénicas, si hubieran casos positivos.

2.15.3 Tipos de vigilancia epidemiológica

Según la FAO, (2007b) la vigilancia de la IA puede ser activa, pasiva, tradicional y dirigida.

- La **vigilancia activa**, se basa en la investigación específica de zonas con poblaciones en riesgo para evidenciar la infección mediante la detección de anticuerpos por serología o la presencia del agente mediante detección viral; los métodos usados pueden ser modificados de acuerdo a la epidemiología de la enfermedad, el servicio veterinario participa en tales procedimientos (FAO, 2006a). La frecuencia de la vigilancia activa de IAAP en países, zonas o compartimentos libres será cada 6 meses; y se combinará la vigilancia aleatoria y específica, usándose métodos virológicos, serológicos y clínicos de acuerdo al riesgo que exista en cada lugar (OIE, 2008).
- La **vigilancia pasiva**, es aquella donde los datos disponibles sobre enfermedades reportadas son utilizados y su reporte es obligatorio.
- La **vigilancia tradicional**, es aquella utilizada en programas oficiales de gobierno donde se muestrean aves en ferias / mercados / rastros / camales / mataderos o frigoríficos, o bien en parvadas. Para esto se usa un muestreo aleatorio.
- La **vigilancia dirigida**, es aquella donde una subpoblación de aves/parvadas es seleccionada para el diagnóstico de enfermedades basado en los factores de riesgo o síndromes asociados con la enfermedad. Esta estrategia es usada para incrementar la sensibilidad y eficiencia del sistema de vigilancia. La Vigilancia Basada en Riesgo y la Vigilancia Sindrómica son parte de este tipo de vigilancia.

2.15.4 Vigilancia epidemiológica de acuerdo al status de la enfermedad

Los sistemas de vigilancia deberán ser evaluados de acuerdo a las prioridades en los países. Según Martin *et al.*, (2007) en países libres de IAAP o aquellos con bajo riesgo de infección, buscarán tener acceso a información detallada y actualizada, enfocando su atención en la detección de su ingreso, haciendo de la vigilancia y alerta temprana sus prioridades; para los países infectados o con alto riesgo de infección las prioridades incluirán la obtención de información detallada y actualizada de los riesgos para la salud humana, zonas ecológicas y sistemas de producción que representen el riesgo más alto de ingreso y permanencia de la IAAP (OIE, 2008)

La vigilancia debe enfocarse en reforzar el seguimiento de la enfermedad en especial en países de riesgo, un mejor control de los mercados de aves y el transporte de aves de corral, con reducción del contacto directo entre personas, aves de corral y aves silvestres; con mejores prácticas de manejo y bioseguridad en establecimientos avícolas (Wetlands International Globalsite, 2007). Según la OIE, estas variables requieren estrategias de vigilancia específicas para cada situación; asimismo la FAO indica que países libres de la infección pero que practican la vacunación, deben comprometer la seguridad de la vacunación en todos sus aspectos.

La vigilancia efectiva en países libres que quieren detectar tempranamente la incursión del virus, deberán implementar actividades en los sitios de alto riesgo o en situaciones donde existe peligro de infección, según Vargas, (2003) estos podrían ser:

- En puntos de entrada en las fronteras internacionales (particularmente en los adyacentes a los países infectados); que comprende la inspección de vehículos de transporte llevando aves muertas o enfermas (con su respectiva toma de muestra para identificación viral).
- En aves acuáticas domésticas; con muestreos de bandadas para detección de la infección por serología, y si existe positividad realizar el aislamiento viral; asimismo se pueden introducir aves centinelas en la granja.
- Cuando exista inusual mortalidad en aves silvestres; en algunos países el virus H5N1 ha sido detectado en aves silvestres muertas, lo que podría indicar una temprana presentación de la IAAP.
- En mercados de aves vivas.

2.15.5 Vigilancia epidemiológica en aves

2.15.5.1 En aves domésticas

La OIE, menciona que la vigilancia de la IAN comprende procedimientos oficiales para detectar, investigar, tomar muestras, registrar, gestionar; y analizar datos de diagnóstico y vigilancia. Asimismo incluye un sistema de detección precoz que abarca la cadena de producción, distribución y transformación de aves, para notificar casos sospechosos; y la prescripción de inspecciones clínicas, periódicas y frecuentes con pruebas serológicas y virológicas de los grupos de aves de alto riesgo como los situados en lugares adyacentes a un país, zona o compartimento infectado o en zonas donde se mezclen aves de corral que vivan cerca de aves acuáticas u otras fuentes de virus de declaración obligatoria.

La vigilancia continua de granjas ubicadas cerca de zonas donde se ha producido brotes para detectar y aislar VIABP, es útil para actualizar los antígenos y continuar con la vigilancia epidemiológica; para escoger la vacuna más adecuada en el caso de la vacunación preventiva en patos (Cherbonel *et al.*, 2007).

Según la FAO (2007c) la vigilancia para una respuesta rápida frente a una epidemia de IA debe incluir:

- Integraciones de productores avícolas comerciales, realizando su propia vigilancia, notificándolo oportunamente.
- Oficiales de centros de control gubernamental de la enfermedad, llevando a cabo vigilancia habitual de instalaciones independientes; y
- Vigilancia orientada hacia instalaciones en el área de control y área de restricción, particularmente enfocadas a lugares infectados, lugares sospechosos, lugares peligrosos de contacto, y a instalaciones con niveles inusuales de la presencia de la enfermedad y mortalidad o mortalidad propiamente.

2.15.5.2 En aves silvestres

Las aves silvestres migratorias son consideradas reservorios naturales de todos los VIA (en su mayoría VIABP); asimismo son especies de alto riesgo para la exposición e infección a los virus de IAAP H5N1 (Martin *et al.*, 2007). Las evidencias circunstanciales sugieren que las aves silvestres pueden jugar un rol importante en la dispersión de los virus H5N1 (*op. cit.*). Asimismo se ha considerado el contacto directo o indirecto de los animales domésticos con las aves acuáticas migratorias como causa frecuente de epidemias (Martin *et al.*, 2006).

Según Whitworth *et al.*, (2007) y Wetlands International Globalsite (2007); los programas de vigilancia activa en aves silvestres sanas deberían ser dirigidas para especies con las siguientes características:

- 1) Especies conocidas de haber sido infectadas con los virus de H5N1;
- 2) Especies conocidas que son reservorios de VIABP;
- 3) Especies de aves que se conoce se agregan estacionalmente a las bandadas, pernoctan, detienen su migración y se entremezclan con los reservorios;
- 4) Especies que potencialmente comparten hábitats con aves de granjas, sistemas integrados de crianza viva en acuíferos, bandadas que se alojan en zonas cercanas o cultivos de arroz;
- 5) Especies cuyos movimientos estacionales o patrones migratorios pueden explicar la dispersión de la enfermedad o su emergencia.

Además la OIE, (2008) menciona que existen programas de seguimiento y control de la ocurrencia, prevalencia y caracterización de los virus en aves silvestres; teniendo en cuenta diferentes rutas migratorias, en particular en los puntos donde se reúnen aves migratorias de diferentes continentes. Por esto El Centro de Emergencia para la Lucha contra las Enfermedades Transfronterizas de Animales (ECTAD) de EMPRES, elaboró un programa sobre enfermedades en la fauna silvestre con apoyo de diversas disciplinas científicas para la

comprensión de múltiples aspectos de la ecología viral de la IA por H5N1, incluyendo estudios sobre el papel de las aves silvestres en la enfermedad (FAO, 2007).

El conocimiento de los VIABP en aves silvestres no puede ser simplemente extrapolado a los VIAAP. Asimismo las especies hospedadoras más importantes pueden tener rutas de transmisión viral diferentes (Ellis *et al.*, 2004; Sturm-Ramirez *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). La vigilancia de los virus proveen una oportunidad para incrementar nuestro entendimiento no solo en la epidemiología de los VIAAP también en la ecología de los VIABP en su hospedero natural, al mismo tiempo y costo (Fouchier *et al.*, 2007).

Los muestreos de aves silvestres en Europa, Asia, África y América demuestran que estas actúan como reservorios de las cepas de IAAP H5N1, y son capaces de llevarlos y dispersarlos a grandes distancias. Además los brotes siguen apareciendo en granjas de aves esporádicamente, lo que sugiere investigar si estas actúan como vectores en la transmisión de virus y su dispersión geográfica (Whitworth *et al.*, 2007; FAO 2007*d*). Finalmente la mayoría de aislamientos virales han ocurrido en patos chapoteros salvajes, asociados con hábitats localizados cerca zonas habitadas por humanos, ganado y otras especies de aves acuáticas (Stallknecht, 1998).

Los monitoreos de los virus en aves silvestres, especialmente acuáticas, podrían mejorar las evaluaciones de riesgo para los productores de aves de corral (Clark y Hall, 2006). Aunque faltan datos sobre poblaciones de aves silvestres y no existe información confiable sobre la prevalencia del H5N1 (Martin *et al.*, 2007); los esfuerzos iniciales en su vigilancia mostraron que 17 de 23 brotes primarios por H5N1 fueron detectados inicialmente en cisnes, gansos y patos enfermos o muertos (FAO, 2007*b*); por este motivo algunos autores recomiendan que la vigilancia directa sea dirigida a aves silvestres enfermas o muertas para la detección temprana de H5N1 (Cuadro 03).

Los resultados de la vigilancia epidemiológica en aves domésticas en China demuestran que el H5N1 había estado circulando entre patos domésticos desde 1999 (Chen *et al.*, 2004); y en un principio logró mantenerse en el sudeste asiático, donde hizo su aparición. Según Beldoménico y Uhart, (2008); hacia mediados del 2005 se especuló que los VIAAP H5N1, podrían extenderse a través de las aves migratorias a otras partes de Asia y Europa, el medio Oriente y África, e inclusive a América.

Promediando el 2006, el virus había sido detectado en 24 países a lo largo de Asia y Europa, y en 3 países Africanos (Alexander, 2007*a*); demostrando una rápida expansión geográfica de la enfermedad, desde el este y sudeste asiático a otros países en dirección occidental. En teoría, la ruta de migración desde Siberia oriental hacia Alaska, o las rutas

desde Islandia vía Groenlandia hacia el norte de Canadá podrían conducir a la introducción del virus al continente americano (Peterson *et al.*, 2007). Una vez en las áreas árticas de América, se postuló que el VIAAP H5N1 sería capaz de seguir las rutas migratorias de norte a sur, extendiéndose a través del Continente Americano, desde el Ártico a Tierra del Fuego (Ver discusión).

Por otra parte el USDA (2006a) elaboró un plan Interinstitucional para la vigilancia de IA en aves silvestres migratorias, describiendo cinco estrategias específicas para la detección oportuna de los virus entre las aves migratorias silvestres:

- Investigación de casos de brotes de la enfermedad en aves silvestres.
- Mayor vigilancia de aves silvestres vivas.
- Vigilancia de aves matadas por cazadores.
- Uso de animales centinelas, como bandadas de aves de corral caseras.
- Muestras ambientales de agua y heces frescas de aves residentes y temporales de los humedales.

Según el PIF & WO (2006) el plan de vigilancia de IA comprende el muestreo de aves silvestres acuáticas y el muestreo de aves centinelas (aves domésticas acuáticas) para detectar infecciones originadas por contacto con aves silvestres, como una potencial herramienta de vigilancia. En esa línea la OIE, (2008) y Martin *et al.*, (2007) reportaron que se han usado patos domésticos como centinelas debido a la susceptibilidad de esta especie a la infección comportándose generalmente como reservorio sin manifestar signos clínicos, esto como método de vigilancia para la detección temprana de la enfermedad.

El USDA - DOI, realizaron monitoreos en miles aves con rutas migratorias de Alaska y ruta de vuelo del Atlántico respectivamente desde 1998 al 2000, encontrando resultados negativos al virus H5N1; sin embargo en el 2005 con el estado de Alaska monitorearon aves silvestres en la ruta del Pacífico, encontrando 22 casos positivos con virus bajamente patógenos de 1700 casos. A pesar de estos resultados que ofrecen poca evidencia de la función que desempeñan las aves migratorias en la transmisión del virus, es necesario realizar una constante vigilancia epidemiológica de estas poblaciones con el fin de notificar la detección de los virus (USDA, 2007).

2.16 USO DE AVES CENTINELAS PARA LA VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD

La centinelización se define como un procedimiento de vigilancia por el cual se introducen animales libres de la enfermedad y sin vacunación en lugares, hábitats o zonas con poblaciones de aves en riesgo, para inducir su transmisión, y determinar si existe presencia del agente infeccioso. De acuerdo a la OIE este método puede ser usado para la vigilancia de

la enfermedad, y según la FAO, (2007b) podría ser considerado un tipo de vigilancia dirigida basada en riesgo a la presentación de la enfermedad.

Este método de vigilancia es aplicable en las siguientes circunstancias:

1. En zonas con riesgo de infección, específicamente en zonas habitables por aves silvestres, para detectar tempranamente la circulación de virus de campo (USDA, 2006).
2. En granjas donde hubieron focos de brotes en granjas de aves domésticas, después de la eliminación de las aves infectadas, durante el período de descanso para la repoblación, para verificar la ausencia del virus en el lugar (Fuller y Max, 2003).
3. En poblaciones de aves vacunadas, como una estrategia DIVA, para determinar si el virus de campo sigue circulando en dichas poblaciones (Capua y Marangon, 2006b; OIE/FAO/IZSve y UE, 2007).

Según el USDA, (2007) la centinelización debería ser diseñada para:

- Determinar localizaciones específicas donde los VIA han sido aislados de aves acuáticas migratorias históricamente.
- Detectar localizaciones donde las especies reservorios primarias (patos silvestres, cerceta azul alado, vuelve piedras colorados, etc) se congregan para la reproducción llevando a la alta concentración de aves juveniles susceptibles a la infección, o en zonas invernales con alta concentración de especies con poca o nula exposición previa, llevando a una alta prevalencia a la infección.
- Determinar la presencia del virus cerca del tiempo que coincide con los periodos (estaciones) de más alta prevalencia en las especies reservorios, en particular especies migratorias que provienen de áreas que tienen altas incidencias de la enfermedad como el Sudeste de Asia.

Inicialmente algunos investigadores como Sinnecker *et al.*, (1982), Halvorson *et al.*, (1985) y, algunos países de Europa como Alemania (Süss *et al.*, 1994) aplicaron la centinelización usando patos, para la detección temprana de los virus. Posteriormente el USDA, (2006) reportó que el uso de patos centinelas en colonias de aves silvestres, mejoró la tasa de detección viral en cinco veces más; esto sugirió que este enfoque tiene sus ventajas para los estudios ecológicos de la enfermedad (USDA, 2007). Por otra parte las aves silvestres no migratorias pueden representar a las aves centinelas tal como lo reportó Slemons *et al.*, (2003).

Hasta el año 2000 se había reportado la presencia de virus en más de 30 lugares en EEUU (Hanson *et al.*, 2000). Por esto la centinelización se convirtió en un método de detección temprana de brotes por VIA en lugares poblados por aves silvestres migratorias del

Norte de Estados Unidos (USDA, 2007); y para la vigilancia activa de enfermedades aviares en la industria comercial (*op. cit.*). Muchos de estos lugares fueron usados como sitios centinelas y comprendieron cuerpos de agua (lagunas o lagunillas) con grandes concentraciones de aves acuáticas migratorias y aves playeras (USDA, 2006).

Según el USDA, (2006) esta metodología se puede aplicar en dos grupos:

- 1.- En grupos de aves de traspatio no comerciales (pollos, pavos, aves acuáticas y aves de torneo) criados cerca de las granjas de aves comerciales las cuales son monitoreadas para detectar la seroprevalencia de agentes selectos de alguna enfermedad como parte de vigilancia sanitaria en granjas comerciales; muchas de estas aves pueden estar en contacto con aves silvestres acuáticas, permitiendo la circulación viral; por este motivo se monitorea un número representativo de estas aves en ferias de torneo (*op. cit.*).
- 2.- En grupos de patos centinelas, introducidos a humedales donde son potencialmente expuestos a una infección con agentes infecciosos que pueden provenir de aves silvestres. Los patos domésticos se han usado para recuperar los virus y detectar epizootias de Influenza en colonias de aves salvajes, ofreciendo una tasa de aislamiento mayor comparada con aislamiento en aves silvestres. Asimismo los patos centinelas han sido usados para calcular la infección asociada con el arribo de aves acuáticas migratorias silvestres a humedales adyacentes a las granjas comerciales de producción de pavos (*op. cit.*).

El USDA menciona que los patos centinelas deberían emplearse en lugares donde las aves migratorias anidan, se juntan o interactúan con otras aves silvestres migratorias que transitan el área antes de la migración de invierno; conllevando a la transmisión de los virus a los patos en los meses de verano, consecuentemente con la infección de pavos 6 a 8 semanas más tarde (Halvorson *et al.*, 1985); sin embargo Hanson, *et al.*, (2000) aislaron virus en 11% de Cercetas y 15% de Patos rabudos en una vigilancia de patos invernales en Texas, sugiriendo que la estación de vigilancia no influye en su detección.

La prevalencia de la infección mediante la vigilancia en aves acuáticas migratorias indica que estos pueden ser detectados principalmente en aves juveniles en áreas de cría de verano (prevalencia cerca del 11 al 61%) (Hinshaw *et al.*, 1985; Hanson *et al.*, 2005); debido a que interactúan en mayor grado con otros grupos con la subsecuente alta tasa de re-infección cuando las aves se juntan para la migración de invierno en Octubre, en el norte del continente americano.

2.17 MEDIDAS ADOPTADAS POR ALGUNOS PAISES PARA CONTRARRESTAR LA ENFERMEDAD

A nivel mundial se ha hablado de controles exitosos de la enfermedad. La erradicación de los brotes de H5N2 en Pennsylvania en 1984 y en Texas en el 2004, en Estados Unidos; el control de los brotes con virus H7N3 en Chile y Canadá con el diagnóstico temprano de la infección, el sacrificio y eliminación de aves infectadas y, en instalaciones afectadas con un programa de lavado, desinfección y vacío sanitario, confirmado con el uso de aves centinelas antes de reiniciar operaciones fueron exitosos (OIE, 2009). Adicionalmente estos países realizaron actividades de vigilancia de los virus de IAAP H5N1 en sus aves silvestres (Rojas y Moreira, 2002; Gonzáles, 2006).

En Europa; Holanda, Bélgica y Alemania en el 2003, optaron por el control mediante sacrificio de aves infectadas en los brotes por virus subtipo H7 con éxito; sin embargo en Italia los brotes secuenciales de IAAP H7N1 motivaron la implementación de la vacunación con vacuna Heteróloga proveniente del virus H7N3 de Pakistán, pudiendo erradicar la enfermedad (Capua y Marangon, 2006b).

En América del Norte, Estados Unidos realizó un control deficiente con el virus H7N2 en algunos estados del noreste de ese país como Delmarva en el 2004, probablemente por el mercadeo de aves vivas que fueron fuente de infección eventual a explotaciones comerciales (García, 2006). Asimismo en Connecticut se implementó un plan piloto de vacunación como alternativa de control contra los virus H7, en granjas de aves con vida larga en el 2003, con mucho éxito (Suarez, 2005). También se autorizó el uso de vacunas para otros subtipos de VIA en pavos y en ponedoras comerciales en California. Por otra parte en México las medidas para el control de brotes por H5N2 de baja patogenicidad, fueron aplicadas deficientemente; lo que motivó la implementación de la vacunación para el control, no obstante los virus permanecen circulando en algunas zonas (CUCBA, 2005).

En varios países de Asia como China, Indonesia, Vietnam, Pakistán; hubieron deficiencias en el control de brotes con la cepa H5N1, por la complejidad en los factores de riesgo involucrados en la diseminación de la enfermedad, motivo por el cual se implementó la vacunación; no obstante los virus aún se mantienen presentes (Peyre *et al.*, 2009). Por otra parte Japón, Taiwán y Corea lograron eliminar el virus eficientemente sin vacunación (OIE, 2009).

2.18 SITUACION DE LA INFLUENZA AVIAR EN EL PERU

Inicialmente desde los reportes de casos de brotes de la enfermedad en Asia a finales de la década de los 90s, se empezó a muestrear aves silvestres de los humedales de la Costa Central. En los Pantanos de Villa se muestrearon 92 aves silvestres de 5 especies para

descartar ENC y VIA entre Agosto de 1999 y febrero del 2000, entre ellas: Águila pescadora (*Pandium haliaetus*), Polla de agua (*Gallinula chloropus*), Gaviota de Franklin (*Larus pipixcan*), Zarcillo (*Larosterna Inca*) y la Gaviota peruana (*Larus belcheri*). Las aves silvestres muestreadas no tuvieron contacto con VIA o ENC (Muñoz *et al.*, 2000, datos no publicados).

Según The Latin America and the Caribbean in the World Economy, (2006) posteriormente en el país se realizó una serie de actividades que involucraron la prevención y control, estas consideraron:

- Un programa de sanidad avícola nacional.
- Una regulación Sanitaria para el resguardo y sacrificio de aves para consumo.
- Una preparación nacional y respuesta a una potencial pandemia de IA.
- Un registro y operación de granjas y plantas de incubación.

En el año 2005 se elaboró un Documento Sustentatorio para la Declaración del Perú como país libre de la Influenza Aviar elaborado por el Programa Nacional de Sanidad Avícola del SENASA. Posteriormente el Código Sanitario de Animales Terrestres aprobado por la OIE declaró al Perú libre de IA en el 2007 (SENASA-MINSA-MINAG, 2008; Agencia Peruana de Noticias - ANDINA, 2009).

El SENASA realizó un adecuado manejo preventivo de la introducción de la IA, donde los establecimientos avícolas comerciales estuvieron debidamente vigilados; el cual es detallado por El Programa Nacional de Sanidad Avícola con ámbito de acción nacional. Por otra parte la cobertura técnico - operativa fue realizada con la colaboración de la Asociación Peruana de Avicultores (APA) y todos aquellos sectores vinculados con la avicultura, en base a los acuerdos y convenios realizados (SENASA, 2005).

Se identificó un modelo epidemiológico para la IA, respecto al movimiento de las masas críticas de aves así como su interacción entre los diferentes tipos de poblaciones; dirigido a todo establecimiento avícola y sus anexos. Por otra parte existió participación de los servicios veterinarios oficiales y privados como moderadores del riesgo sanitario. Este modelo incluyó la participación de entidades privadas involucradas con la industria avícola, y la investigación relacionada con la vigilancia de la enfermedad en aves silvestres (SENASA, 2005).

El MINSA, realizó un Plan nacional de preparación y respuesta frente a una potencial pandemia de Influenza en el 2005 que incluyó entre otras medidas importantes; la vigilancia, seguimiento y evaluación de la situación epidemiológica de la IA en todos sus ámbitos con la intervención de otras entidades del estado.

En aves silvestres Gheri *et al.*, (2009) detectó genotipos de los VIA circulando entre las aves silvestres de la Costa Central, en muestras de heces frescas entre los años 2006 y 2007. Esta investigación comenzó en Junio del 2006 paralelamente a la metodología aplicada en este estudio. Posteriormente los 9 aislados recuperados representaron 4 cepas bajamente patógenas de los subtipos H3N8, H4N5, H10N9 y H13N2.

Desde finales del 2007 hasta el 2009, se siguieron aislando genotipos de virus bajamente patógenos, lo interesante fue que se hallaron en aves migratorias y aves residentes de los humedales en todos los meses del año, inclusive en temporadas donde no se registró altas densidades en poblaciones de especies migratorias (Icochea, comunicación personal).

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material y equipo de laboratorio

3.1.1.1 Para la colección de muestras

- a). **Hisopados cloacales**, se utilizaron guantes de látex, una mascarilla N95 o FFP2, protector para ojos; crioviales de 2,5 ml. con tapa rosca; hisopos estériles con punta de rayón o dacrón, tijeras, algodón, gasa estéril, alcohol, refrigerador, 1 cooler para almacenar las muestras, 7 geles refrigerantes.
- b). **Suero**, se utilizaron 50 tubos de ensayo de 3ml. con tapa, 50 agujas N° 21, 1 gradilla, 2 frascos de plástico de boca ancha de 100 ml.

3.1.1.2 Para las pruebas de diagnóstico

Se utilizaron 100 agujas de 1 ml. tipo insulina, 12 agujas de 1 ml. tipo tuberculina, 1 mechero, cámara de bioseguridad con flujo laminar de nivel tipo 2, 1 ovoscopio, 1 taladro pequeño, 2 micropipetas graduadas de 0.5 ml. y 1 ml. de capacidad, yodo, algodón, 100 crioviales de 1.25 ml. para colección del fluido alantoideo, 72 tubos de plástico de 2 ml. para colección de sueros, 8 placas microtituladas con 96 pozos para la prueba de HA e IH; sacabocados hexagonal para gel de agarosa y gotero dispensador de glóbulos rojos con cabeza de goma.

3.1.1.3 Para la extracción del suero

Se utilizó una centrífuga pequeña para tubos de ensayo y 48 viales estériles de 2 ml.

3.1.2 Reactivos e insumos de laboratorio

3.1.2.1 Para la colección de muestras.- para preparar el medio de preservación viral se utilizó:

- Medio para cultivo celular.
- Albúmina de suero bovino.
- Antibiótico de nombre comercial Pen-Strep, compuesto de Bencylpenicilina 200 000 UI., más Dihidroestreptomicina base 200 mg. por ml. de solución. Este se usó antes del procesamiento de las muestras.

3.1.2.2 Para las pruebas de diagnóstico.- se utilizó:

- Agar Gel.
- Solución fosfato salina amortiguada en pH (PBS).
- Buffer fosfato.
- Agua destilada.
- Agua desionizada.
- Alcohol.
- Yodo.
- Cloruro de sodio (NaCl).
- Glóbulos rojos de ave (lavados con PBS).

3.1.3 Material auxiliar

3.1.3.1 Para la identificación del lugar de estudio y descripción de resultados

Material informativo

- Información de la base de datos, acerca de la ubicación geográfica de humedales en Lima, del Instituto Nacional de Recursos Naturales (INRENA) para la ubicación y descripción de los humedales en el Departamento de Lima.

Material de oficina

- Para la descripción de los resultados se utilizó; hojas patrón para encuestas, fichas para registro, tablero de campo, pabito, y material de oficina (hojas, lápiz, lapiceros, marcador indeleble, borrador, estiques para identificación de los establecimientos).
- Audiovisual (cámara fotográfica).

3.1.3.2 Para registro y evaluación de los animales

- Hojas para el llenado de antecedentes y evaluación clínica general.
- Marcador de cera para animales, cintas de seda de color azul y verde para identificación por sexo, guantes, maskintape, tijeras y pinzas.

3.1.4 Material biológico

- 120 huevos embrionados SPF de gallina, de 9 a 11 días de edad.
- Antígeno de virus de Newcastle.
- Antígeno de virus de Influenza Aviar preparado, que contiene antígenos de la matriz y de la nucleocápside inactivados con formalina al 0.1%.

3.1.5 Animales de estudio

3.1.5.1 Determinación de la especie de animales para el estudio

De acuerdo a las referencias consultadas, las aves del orden *Anseriformes*, género *Anatidae*, especie *Anas*, son las más susceptibles a la infección natural por los VIA. Por este motivo se usaron patos domésticos (*Cairina moschata*) por su manejo accesible y relativa facilidad en la recolección de muestras a diferencia de otras especies de aves o sus variedades. Por otra parte la FAO indica que los patos jóvenes son más susceptibles y tienen más altas tasas de infección y eliminación viral.

Para el presente trabajo se usaron como aves centinelas, 12 patos domésticos jóvenes de variedad Muscovy línea Francesa de 16 semanas de edad. Asimismo los animales fueron distribuidos en 2 grupos de acuerdo al sexo; 6 hembras y 6 machos.

3.1.5.2 Determinación de la cantidad de animales a usar y el tiempo de estudio

De acuerdo al USDA, (2006); para la aplicación de esta metodología se sugiere utilizar 10 a 20 aves centinelas por cada humedal o lago habitado por aves silvestres.

Se fijó un tiempo de observación en el estudio de 70 días, teniendo en cuenta;

- La tasa de contacto dependiendo del contexto en que se desarrolla la enfermedad en aves domésticas y silvestres, esta puede llegar hasta 50% (considerándose aquí de 20 a 30%, es decir de 20 a 30 aves contactan con el virus de un total de 100 en un año). Esta tasa se produce directamente a través de contacto con aerosoles y secreciones o indirectamente a través de excreciones en el agua, tierra o alimento (OIE, 2005).
- La prevalencia general de la infección por VIA en las aves silvestres (Olsen *et al.*, 2006).
- La población de aves silvestres residentes en la zona (aproximadamente 616 individuos distribuidos en 25 especies) de acuerdo al censo realizado por el Grupo de aves del Perú (GAP) (Acuy & Pulido, 2007).

Por las características del lugar, este tamaño de muestra también se aplicó para la detección de VIA que podrían estar circulando en los humedales por dispersión de

aves portadoras residentes del lugar que contrajeron la infección en estaciones anteriores de migración o por aves costeras de las playas colindantes a los humedales.

3.1.6 Recursos humanos disponibles

Para la recolección de los datos y la toma de muestras se contó con el apoyo de trabajadores del residencial de los humedales de Puerto Viejo; y para el procesamiento de las muestras se contó inicialmente con el apoyo de personal capacitado en las pruebas de diagnóstico de laboratorio del Laboratorio de Patología Aviar de la FMV de la UNMSM.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preliminares

3.2.1.1 Criterios tomados para la implementación de la metodología usada

Teniendo en cuenta recomendaciones sugeridas en anteriores investigaciones sobre la ecología y comportamiento de las aves silvestres, y su relación con la Influenza aviar (Blanco, 2009), se consideraron los siguientes factores para el desarrollo del estudio:

- El hábitat donde conviven las aves silvestres (área de humedales rodeados de áreas urbanas), que comprende cuerpos de agua (pequeños bañados y lagunas), rodeados de pastizales tipo gramadales, árboles y más lejanamente dunas y peñas, con interiores de agua dulce.
- La población; por la presencia de poblaciones de aves silvestres residentes migratorias y no migratorias presente en los humedales durante todo el año.
- La presencia de especies de aves silvestres de alto riesgo que tienen la posibilidad de contraer y transmitir los VIA, si en su migración atraviesan algún área donde halla un brote de la enfermedad donde podrían infectarse; asimismo la presencia de aves residentes permanentes no migratorias (Ver tabla 01).
- El riesgo de contacto con las aves de corral, dado la amenaza que significa una determinada especie por el riesgo a dispersar los virus en zonas donde habitan aves domésticas de crianza comercial o de traspatio, sobretodo en el caso de aves silvestres migratorias cercanas.
- La mezcla entre especies; se consideró una especie que fácilmente se mezcla con otras, siendo más susceptible a contagiarse con los virus (en este caso la especie de ave usada como centinela (Pato doméstico, *Cairina moschata*)).
- El gregarismo; por el tamaño en el grupo de individuos en la especie. Este puede ser **grande** (cientos a miles), **mediano** (decenas a cientos), **pequeño** (decenas) para otras, y **solitario** (pocos individuos). La densidad de las especies se consideraron en bandadas / grupos compactos, manteniendo una distancia menor a 2 m. entre individuos.

3.2.1.2 Lugar de estudio (áreas de investigación y evaluación)

El trabajo se desarrolló en los siguientes lugares:

- La evaluación de campo; en los humedales que circundan a la laguna de Puerto Viejo, al sur de Lima (altura del Km. 74 de la Carretera Panamericana Sur - Distrito de Chilca / Provincia de Cañete), los cuales se encuentran poblados por aves silvestres que residen temporal y permanentemente en la zona.
- El procesamiento de las muestras de suero e hisopados cloacales, se realizó en el Laboratorio de Patología Aviar de la FMV de la UNMSM.
- El análisis de datos de la información recolectada y los resultados de laboratorio, se realizó en el Laboratorio de Medicina Veterinaria Preventiva de la FMV de la UNMSM.

a). Descripción geográfica y ecológica de los humedales

a.1). Descripción geográfica

Los humedales de Puerto Viejo forman parte del corredor biológico del Pacífico y están ubicados en la costa central del país, en el distrito de San Antonio de Chilca, provincia de Cañete, departamento de Lima a 77°35'20" latitud Oeste, y a 11°11'26" latitud Sur; y a una altura de 0 msnm. Como ecosistema involucra aproximadamente unas 350 hectáreas, con un clima semi-cálido muy seco, con precipitaciones de 60 mm. de promedio anual, una temperatura media anual de 19°C y una humedad relativa que fluctúa entre 85 y 99% (INRENA) (Ver anexo 06)

Los humedales se caracterizan por poseer pantanos temporales y cuerpos de agua permanentes (lagos y lagunillas), los que están integrados a la cuenca del Río Mala (que recarga flujos de agua subterránea) y a los canales de irrigación de San Andrés, que junto a las infiltraciones de agua del subsuelo proveniente de las actividades agrícolas, influyen en la formación de extensas áreas hidromórficas cuyos niveles de agua son variables y periódicos, manifestándose en descensos de la napa freática durante los meses de verano (Diciembre a Marzo) y aumentando durante los meses de invierno (máximo nivel durante el mes de Julio) dependiendo de esto su origen y conservación (INRENA) (Ver anexo 06)

El reconocimiento de los humedales de Puerto Viejo se debió principalmente a su importancia biológica, contribuyendo en la conectividad entre humedales costeros, incluyendo áreas Naturales Protegidas y sitios RAMSAR, sirviendo de este modo como sitio de descanso y paradero de aves migratorias en situación vulnerable; además de poseer varias comunidades bióticas, albergando especies endémicas de la región (INRENA).

a.2). Descripción ecológica (fauna silvestre)

Como se mencionó las especies registradas en los Humedales de Puerto Viejo están presentes todo el año, sin embargo las mayores densidades en la población de aves se registran entre los meses de Noviembre a Abril, por la presencia de las especies migratorias. Cabe resaltar que como resultado preliminar se identificó a las especies de aves silvestres presentes durante el tiempo de evaluación mediante visualización paralelamente a la observación de la interacción de estas especies silvestres con las aves centinelas.

De acuerdo a las referencias citadas, entre las especies de aves silvestres destacadas se encuentran: el Zambullidor Grande (*Podiceps major*) el Zambullidor Picogruoso (*Podilymbus podiceps*) la Garza Grande (*Ardea alba*) el Huaco Común (*Nycticorax nycticorax*) el Pato Colorado (*Anas cyanoptera*) el Pato Gargantillo (*Anas bahamensis*) el Águila Pescadora (*Pandion haliaetus*) la Polla de Agua (*Gallinula chloropus*) la Gallareta (*Fulica americana*) el Playero Patiamarillas Mayor (*Tringa melanoleuca*) y el Chorlo Gritón (*Charadrius vociferus*) (Las aves y los humedales de Puerto Viejo (Anónimo)) (Ver Cuadro 08 del apéndice II).

3.2.1.3 Periodo de estudio (fundamentación del tiempo de evaluación)

El tiempo de alojamiento y evaluación experimental de las aves centinelas en los humedales fue de 70 días durante el invierno del año 2006, empezando el 19 de Junio hasta el 29 de Agosto del 2006.

El periodo de estudio se desarrolló en dichos meses por las siguientes razones:

1. Para la detección temprana de los VIA que podrían estar circulando en los humedales por dispersión de las aves silvestres migratorias y de las aves silvestres residentes del lugar que podrían ser portadoras del virus por contagio en estaciones anteriores de migración, o por aves costeras de las playas colindantes a los humedales.
2. Por las condiciones climáticas favorables para el mantenimiento de los VIA (bajas temperaturas y alta humedad) favorable para el agente, que ocasionaría mayor incidencia de problemas respiratorios y probabilidad de difusión de los VIA a las aves centinelas.
3. Para esclarecer en parte el rol de las aves silvestres residentes de estos humedales en la transmisión de los VIA a poblaciones de aves de crianza comercial ubicadas en granjas cercanas (distancias menores a 3 km.) en este periodo relativo de inactividad migratoria.

Cabe señalar que paralelamente a esta investigación se realizaron muestreos de heces frescas de las aves silvestres residentes de los humedales para aislamiento viral.

3.2.1.4 Manejo de los animales de estudio

Se evaluó previamente la condición de las aves de ser libres a la infección por los virus de IA y de la ENC, mediante aislamiento viral por inoculación en huevos embrionados a partir de muestras de hisopado cloacal y detección de anticuerpos por AGID para los VIA e IH para ENC.

Se transportaron las aves mediante jaulas desde la Granja avícola de la FMV - UNMSM a los humedales de Puerto Viejo. Inicialmente se introdujeron (alrededor de la laguna). Previamente se realizó el corte de las plumas primarias o remeras de las alas para evitar que vuelen y se alejen excesivamente de la zona de estudio, asimismo las aves fueron identificadas individualmente mediante lazos en forma de anillo en las patas, de color verde para las hembras y azul para los machos.

Finalmente se les suministró alimento en una cantidad de 2 kilos diarios para todos los animales, repartidos en dos raciones al día; y se realizó la inspección de la zona tres veces por día (cada 6 horas) durante 45 minutos comenzando a las 6 a.m., para registrar su comportamiento e interacción con las demás aves residentes.

3.2.1.5 Seguimiento de las aves

Este procedimiento se realizó mediante el registro de lo siguiente:

- Comportamiento e interacción de las aves centinelas con las aves silvestres residentes de la zona.
- Identificación semanal de las poblaciones de aves silvestres no migratorias residentes y migratorias.
- Evaluación del estado clínico periódico de las aves.
- Evaluación del estado de infección periódico de las aves.

Para la colección de muestras, se condicionó a las aves centinelas a la administración de alimento para poder capturarlas.

3.2.2 Evaluativos

3.2.2.1 Evaluación clínica

La evaluación clínica se realizó en forma grupal durante la mañana en todo el período de estudio. La frecuencia de la evaluación fue diaria los primeros 21 días, interdiaria los siguientes 21 días y dos veces por semana durante el tiempo restante (28 días).

La evaluación consistió en la detección visual de algún signo de tipo respiratorio, digestivo o nervioso característico de la enfermedad, así como la evaluación del estado general de las aves en forma visual (no se manipularon los animales para este fin, debido al estrés que les produce dicha actividad).

3.2.2.2 Evaluación de laboratorio

a). Evaluación de la presencia viral

La detección viral, se realizó mediante muestreos periódicos de hisopados cloacales para aislamiento viral por inoculación en huevos embrionados de pollo.

b). Evaluación serológica

Se utilizó la prueba de AGID, para la detección de anticuerpos en suero contra los virus de Influenza tipo A; y la prueba de IH para monitorear la infección por virus de ENC al inicio y al final de la evaluación (Cuadro 01).

Cuadro 01. Cronograma periódico de muestreo de las aves centinelas

Día de toma de muestra	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 70
Suero	x		x		x	x
Hisopado cloacal	x	x	x	x	x	x

3.2.3 Toma de las muestras

Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito previamente. Swayne *et al.*, (1998) y Rose *et al.*, (2007).

3.2.3.1 Hisopado cloacal

Se realizó progresivamente el siguiente procedimiento:

- Se realizó mediante la introducción del hisopo dentro de la cloaca y removiendo circularmente para rozar las paredes del recto.
- Las muestras se almacenaron en crioviales de 2.5 ml., con 2 ml. de un medio de preservación viral estéril, que constaba de un medio de cultivo celular enriquecido con 1% de albúmina de suero bovino.
- Después de colectadas, las muestras se rotularon con un número de identificación del ave de acuerdo al sexo y a la fecha de colección.
- Finalmente fueron transportadas en un contenedor con geles a 4°C, fuera de la luz solar.

- El procesamiento en laboratorio se realizó dentro de las 24 horas siguientes a la colección.

3.2.3.2 Suero

Se realizó progresivamente el siguiente procedimiento:

- Se ubicó y desinfectó la zona ventral del ala con yodo.
- Se realizó la toma mediante punción de la vena alar con una aguja N° 21, inclinando el ala mediante sujeción para la caída de sangre y se colectó en tubos de vidrio estériles de 2 ml.
- Se desinfectó la zona punzada y se realizó la hemostasia por 30 segundos.
- Las muestras fueron rotuladas igualmente con un número de identificación de acuerdo al sexo y a la fecha de colección.
- Se transportaron las muestras en un contenedor con geles a 4°C, fuera de la luz del sol.
- El procesamiento de los sueros se realizó dentro de las 48 horas siguientes a la colección.

3.2.4 Procesamiento de muestras

Las pruebas aplicadas son descritas en el Cuadro 02.

Cuadro 02. Pruebas desarrolladas para la detección viral y determinación de la seroconversión

Examen realizado	Prueba empleada
Detección de anticuerpos contra el virus de IA en suero	AGP (Precipitación en Gel de Agar) solo al inicio de la evaluación
Detección de anticuerpos contra el virus de la ENC en suero	IH (Inhibición de la hemaglutinación)
Aislamiento viral de las muestras de hisopado cloacal	Inoculación en huevos embrionados.
Detección de Ag viral hemaglutinante del fluido alantoideo de los huevos embrionados inoculados	HA (Hemaglutinación directa)

Senne, 1998; Swayne *et al.*, 1998; Villegas, 1998.

3.2.4.1 Para aislamiento viral

a). Inoculación en huevos embrionados

La técnica de aislamiento viral mediante la inoculación de huevos embrionados se realizó de acuerdo a los procedimientos usados por Senne, (1998) y el Manual de Procedimientos de la OIE, con algunas modificaciones adicionales prácticas mencionadas por algunos autores como; Swayne *et al.*, (1998); Swayne y Halvorson, (2003), y FAO, (2007b). Por otra parte durante la preparación del inóculo, la

inoculación y la cosecha del fluido alantoideo, se utilizó una cabina de bioseguridad clase 2, tal como lo establece la FAO, (2007b).

a.1). Preparación del inóculo

- Los crioviales fueron removidos por un shaker de tubos pequeños por 1 minuto, para la remoción de los sedimentos.
- El contenido de los viales (3 por pool) sin el hisopo, fue colectado en tubos de ensayo de 5 ml. estériles.
- Se adicionó 0.2 ml (3 gotas) de antibiótico de nombre Pen-Strep para inhibir el crecimiento bacterial.
- Se removió el contenido del tubo y se incubó por 3 horas a temperatura ambiente.
- Se colectó el contenido del tubo a otro tubo de ensayo estéril, filtrándolo por una capa de gasa estéril.

a.2). Procedimiento de inoculación

- La ruta de inoculación fue la vía saco alantoideo.
- Se verificó la viabilidad de los huevos a usar mediante su observación en el ovoscopio y se identificó la zona de la cámara de aire identificando con lápiz.
- En la cámara de bioseguridad se desinfectó la zona con yodo y se trazó un círculo con marcador indeleble sobre la cámara de aire.
- Se realizó cuidadosamente un pequeño agujero con el taladro en la cáscara sobre la zona marcada del huevo.
- Usando una jeringa tipo insulina con una aguja N° 25 por 5/8 de pulgada, se administró 0.2 ml. del inóculo resultante del contenido final de los tubos del paso anterior, en forma vertical a través del agujero en la cáscara o en ligero ángulo lejos del centro del huevo.
- Se selló el agujero de la cáscara con parafina líquida y se guardaron los huevos en la incubadora.
- Los huevos inoculados fueron mantenidos a 37°C por 7 días y se miraron por el ovoscopio diariamente para descartar muerte de los embriones en el tiempo de incubación. A medida que se comprobaba la existencia de embriones muertos o moribundos, estos fueron refrigerados a 4°C.

a.3). Cosecha del fluido alantoideo

A los 7 días de incubación se realizó la colección del fluido alantoideo, de los embriones vivos o muertos.

- El procedimiento se inició mediante golpeó de la cáscara en la zona de la cámara de aire con el mango de la tijera de cirugía.

- Se procedió a la extracción del fluido alantoideo con la pipeta graduada y se colectó 2 ml. del contenido en tubos estériles para su nuevo procesamiento y almacenamiento.
- Se comprobó la actividad hemaglutinante de los fluidos mediante la prueba de HA.
- Finalmente todos los fluidos fueron almacenados a temperatura de congelación de - 20°C.
- Todos los embriones fueron examinados para descartar anomalías en los embriones compatibles con algún agente infeccioso.

b). Procesamiento del fluido alantoideo

Se realizó mediante la prueba de HA, de acuerdo a lo señalado en el Manual de Procedimientos de la OIE, y Rose *et al.*, (2007). Esto comprendió progresivamente los siguientes pasos:

- Se recolectó el fluido alantoideo de todos los huevos incubados o refrigerados hasta el día 7.
- Se utilizó glóbulos rojos de aves. La preparación se realizó mediante extracción de sangre con anticoagulante de 3 pollos o mas, posteriormente se extrajo el contenido celular mediante centrifugación y lavado con solución salina buferada (PBS) (0.1M) a un pH de 7.2 por al menos 4 veces. Una vez lavados, se preparó la solución madre al 25% mantenida a 4°C hasta por una semana. De esta solución se preparó la suspensión a usar de 1% (paquete celular / volumen).
- Procedimiento de la prueba HA
 - Se usaron placas de vidrio dividivo en cuadrantes, donde se adicionó 25 µl. de solución buferada en cada cuadrante de la placa.
 - Se colocó 25 µl. del fluido alantoideo en el primer cuadrante. Para determinación exacta del contenido HA, se realizó un rango cercano de diluciones de 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc.
 - Se realizó diluciones de 25 µl. del fluido a través de la placa dos veces.
 - Se dispensó un adicional de 25 µl. de PBS en cada cuadrante progresivo.
 - Se dispensó 25 µl. de la suspensión al 1% (v/v) de los glóbulos rojos de pollo en cada cuadrante.
 - Se mezcló la placa mediante movimientos circulares para permitir que los glóbulos rojos se asienten por 40 minutos a una temperatura ambiente.
 - La actividad hemaglutinante se determinó mediante inclinación de la placa observando la presencia o ausencia de la gota formada de glóbulos rojos. La titulación fue hecha de acuerdo a la más alta dilución que

produjo la actividad hemaglutinante (1 UHA) hasta el rango inicial de dilución.

3.2.4.2 Pruebas de detección de anticuerpos

a). Prueba de AGID

Para esta prueba se utilizó Gel de Agar al 8 %, NaCl al 0.1 M, y buffer fosfato; a un pH de 7.2. También se utilizó un concentrado preparado de virus de Influenza que contiene antígenos de la matriz y de la nucleocápside inactivados con formalina al 0.1%.

El procedimiento se realizó de acuerdo al Manual de Procedimientos de la OIE, y comprendió progresivamente los siguientes pasos:

- Se dispensó el gel de Agarosa sobre la placa petri a un espesor de 2 a 3 mm.; luego se realizó siete agujeros con un sacabocado (seis en forma de hexágono y uno central) a una distancia de 2.4 mm. ubicados equidistantemente, con 5.3 mm. de diámetro.
- Se adicionaron aproximadamente 50 ul. de los contenidos a cada pozo, con la micro pipeta. El extracto de antígeno preparado se colocó en el pozo del centro, los sueros controles en 3 pozos circundantes intercalados con los 3 pozos donde se colocaron los sueros problema.
- Se dejó incubar a temperatura ambiente y se hizo la lectura de la prueba a partir de las 24 hasta las 48 horas, verificándose la existencia de la línea de precipitación formada entre el antígeno y los sueros sospechosos colectados de las aves individualmente, a contraluz en una base de fondo negro.

b). Prueba de IH

El procedimiento se realizó de acuerdo a lo señalado por Villegas, (1998) y al Manual de Procedimientos de la OIE; y comprendió progresivamente los siguientes pasos:

- Se dispensó 25 µl. de PBS en cada pozo micro titulado de la placa.
- Se colocó 25 µl. del suero sospechoso en el primer pozo de la placa
- Se realizó dos diluciones de 25 µl. en el volumen del suero con PBS a través de la placa.
- Se adicionaron 4 Unidades Hemaglutinante (UHA) de virus/antígeno de ENC en 25 µl. a cada pozo y se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se adicionó 25 µl. de la suspensión al 1% (v/v) de glóbulos rojos de pollo a cada pozo y después se mezcló suavemente, para que los glóbulos rojos se sedimenten por 40 minutos a temperatura ambiente.
- Se observó y determinó si existió algún título de Inhibición de Hemaglutinación de las 4 UHA.

- La aglutinación fue observada mediante inclinación de la placa.

3.2.5 Descripción de resultados

Luego de aplicación del método de vigilancia dirigida para la detección temprana del virus de IA, se realizó:

- Identificación general visible de algunos factores de riesgo probables que pudieron intervenir en la transmisión de los VIA a las aves centinelas.
- Identificación general de especies de aves silvestres presentes en el lugar de la evaluación, y un cálculo aproximado de la cantidad de visitas de aves migratorias en el período de observación.
- Descripción del comportamiento e interacción entre las aves centinelas con las aves silvestres residentes permanentes y temporales del lugar, durante el período de evaluación.
- Descripción de la existencia o ausencia de signos clínicos compatibles con la enfermedad en las aves centinelas.
- Determinación del estado de infección por VIA en las aves centinelas, mediante detección de anticuerpos y el aislamiento viral.
- Esquematización de los resultados.

3.2.6 Análisis de datos

Debido a que el objetivo específico del presente estudio fue la detección de la presencia de los VIA tempranamente en la población de aves silvestres residentes en los humedales de Puerto Viejo mediante la vigilancia dirigida, inicialmente solo se consideró en este análisis, la determinación de la presencia o ausencia de la infección viral en las aves centinelas.

Con los resultados obtenidos posteriormente, se realizó un modelo estadístico de los datos aplicando la prueba de Goal Seeking, para estimar el comienzo de la presentación de un evento (1%), con una probabilidad del 99% (en este caso la transmisión del virus a las aves centinelas) en un tiempo determinado, tomando varios datos como;

- Prevalencia de la infección en la zona.
- Riesgo de contacto con el virus (conocida como tasa de ataque de la enfermedad, siendo 20 a 30% en el caso de Influenza Aviar para aves domésticas). Cabe señalar que la rápida dispersión del virus en brotes de IA hace que la tasa de contacto en aves domésticas sea alta llegando hasta 100% (OIE, 2009), a diferencia de aves silvestres donde la tasa de contacto por VIA en lugares prevalentes puede ser moderado de 20 a 30%, sin embargo la tasa de

letalidad puede ser baja en este grupo principalmente debido a su adaptación al virus.

- Tiempo de observación en el estudio.
- Cantidad total estimada de visitas de aves migratorias en el período de observación.
- Cantidad estimada de aves migratorias enfermas que visitaron a las aves centinelas.
- El número total de contactos efectivos entre aves centinelas y silvestres.
- La probabilidad de lo observado.

IV.- RESULTADOS

4.1 Resultados preliminares

Se consideraron dos aspectos que permitieron identificar, conocer y describir en forma general las condiciones en las cuales se desarrolló la investigación.

4.1.1 Identificación visible de factores de riesgo probables para transmisión de los VIA durante el estudio

Después de la observación en el estudio fueron identificados algunos factores de riesgo para la transmisión de los VIA categorizados en general y ambiente-natural de acuerdo al cuadro 04 de la sección II (FAO, 2004). Estos son:

- Presencia de grupos de aves silvestres residentes migratorias y no migratorias en los humedales (Tabla 01), algunas conocidas de ser reservorios de los VIA (Ver Cuadro 06 sección II), también de un grupo de Patos Pekin (*Anas platyrinchos*) y los Gansos Domésticos (*Anser anser*) que residían permanentemente en dichos humedales 6 meses antes al inicio del estudio.
- Cercanía de una playa colindante a los humedales, habitada por varias especies de aves costeras presentes durante el periodo de evaluación (Ver anexo 06).
- Tránsito de personas en el trayecto de la salida de los humedales a la carretera, y presencia de grupos de patos silvestres residentes migratorios cercanos como Patos Gargantillo (*Anas bahamensis*) y Patos Colorados (*Anas cyanoptera*) que habitaban algunas pequeñas lagunillas colindantes a dicho trayecto (Ver Cuadro 06 sección II).
- Presencia de un ave joven muerta en el lugar perteneciente a la especie Cushuri (*Phalacrocorax olivaceus* - Cormorán), encontrada en una de las lagunillas

habitadas por las aves centinelas a los 15 días del inicio del período de evaluación.

Tabla 01. Especies de aves silvestres identificadas durante el tiempo de evaluación

	Nombre común	Nombre científico
-	Zambullidor Grande	<i>Podiceps major</i> *
-	Zambullidor Pimpollo	<i>Rollandia Rolland</i> *
-	Cushuri (Comorán)	<i>Phalacrocorax olivaceus</i> *
-	Pelicano Peruano	<i>Pelicanus thagus</i> *
-	Garza Blanca Chica	<i>Egretta thula</i> ****
-	Garza Pechiblanca	<i>Egretta tricolor</i> ****
-	Pato Gargantillo	<i>Anas bahamensis</i> *
-	Pato mallard	<i>Anas platyrhynchos</i> *
-	Aguila Pescadora	<i>Pandion Haliaetus</i> *
-	Aguilucho Grande	<i>Geranoaetus melanoleucus</i> *
-	Polla de Agua	<i>Gallinula chloropus</i> *
-	Gallareta	<i>Fulica ardesiaca</i> *
-	Gallineta Común	<i>Rallus sanguinolentus</i> *
-	Ostrero Común	<i>Haematopus palliatus</i> **
-	Zarapito Trinador	<i>Numenius phaeopus</i> ** / ****
-	Vuelve Piedras	<i>Arenaria interpres</i> ** / ****
-	Gaviota Dominicana	<i>Larus dominicanus</i> ** / ****
-	Gaviotín Peruano	<i>Sterna lorata</i> *
-	Cuculi	<i>Zenaida Meloda</i> *
-	Tortolita Peruana	<i>Columbina cruziana</i> *
-	Golondrina Migratoria	<i>Hirundo rustica</i> ****
-	Fragata	<i>Fregata magnificens</i> ** / *** / ****
-	Espatula rosada	<i>Ajaia ajaja</i> ** / *** / ****
-	Gaviotín Real	<i>Sterna maxima</i> *** / ****
-	Aguilucho Aliancho	<i>Buteo platypterus</i> **** / ****

* Especie residente

** Especie conocida de ser reservorio de los VIA (Olsen *et al.*, 2006)

*** Especie con una o dos observaciones durante el tiempo de evaluación

**** Especie migratoria (Ver procedencia en el cuadro 08 del apéndice II)

Total de especies identificadas: 25

NOTA: Los gansos domésticos fueron parte de la población residente permanente en los humedales y no fueron considerados dentro de estas poblaciones de aves silvestres.

4.1.2 Comportamiento e interacción de los patos centinelas con las especies de aves silvestres residentes

4.1.2.1 Lineamientos considerados en la evaluación

El comportamiento e interacción involucraron actividades fisiológicas que van desde la mezcla de individuos cuando comen, su permanencia en las fuentes de agua o en los pastizales, permanencia en lugares donde descansan durante el día o cuando pernoctan, hasta el acicalamiento en los revolcaderos del suelo y en la tierra. Estas actividades determinan el contacto entre las aves centinelas y residentes del lugar. El grado de interacción se clasificó subjetivamente como **débil, moderado o fuerte**, teniendo en cuenta la frecuencia y el tiempo de estas actividades a las observaciones periódicas.

4.1.2.2 Resultados de la evaluación del comportamiento e interacción

- Durante la primera semana, los patos comenzaron a alejarse del lugar de alojamiento (hasta 100 m. aproximadamente) dispersándose en los humedales y entrando a las fuentes de agua de las lagunillas; sin embargo el grado de interacción con especies diferentes residentes en el lugar, fue débil, a diferencia de la observada con los grupos de Patos Pekin y Gansos Domésticos residentes que fue moderada.
- Durante la segunda semana, los patos se alejaron más del lugar de alojamiento (hasta 200 m. aproximadamente). El grado de interacción fue fuerte con los grupos residentes de Patos y Gansos, y fue débil con otras especies de aves silvestres como Garzas Blancas, Garcetas, Gallinetas, Vuelve Piedras y Cormoranes jóvenes, los cuales tuvieron un grado de gregarismo pequeño a mediano.
- Durante la tercera semana los patos se alejaron aún más del lugar de alojamiento (aproximadamente de 300 m. a más). El grado de interacción fue moderado con las distintas especies de aves silvestres residentes no migratorias presentes en el lugar; asimismo el gregarismo en las especies presentes fue pequeño a mediano, con mayor población de Cormoranes en algunas observaciones, sobretodo al mediodía.
- En las siguientes 7 semanas el grado interacción de los patos con las aves silvestres residentes fue aumentando hasta llegar a un grado de moderado a fuerte con todas las especies migratorias y no migratorias residentes de los humedales, asimismo se observó un grado de interacción débil con algunas aves provenientes de la playa colindante a los humedales como Ostreros,

Gaviotines, Aguiluchos los cuales tuvieron un gregarismo pequeño a mediano; y con los Pelicanos que tuvieron un gregarismo solitario.

Durante el tiempo de evaluación se pudo estimar la cantidad de visitas de aves silvestres a la zona de alojamiento de las aves centinelas; esta fue variable, no obstante se puede considerar un rango de 5 a 50 aves silvestres que visitaron el lugar de estudio diariamente (hasta donde se dispersaron las aves centinelas), durante todo el período de evaluación.

4.2 Resultados propios de la evaluación en el estudio

4.2.1 Determinación del estado clínico y de infección compatible con la infección por VIA en las aves centinelas

- A la evaluación clínica no se observaron signos clínicos de tipo respiratorio, digestivo o nervioso característicos o compatibles con la enfermedad hasta el final del periodo de la evaluación.
- Los resultados de la prueba de AGID fueron negativos a la detección de anticuerpos contra el VIA en los patos centinelas; tampoco se observó actividad hemaglutinante del fluido alantoideo de ninguno de los huevos embrionados que fueron inoculados con las muestras de hisopado cloacal (Tabla 02).

Tabla 02. Detección de anticuerpos y aislamiento viral en suero e hisopado cloacal

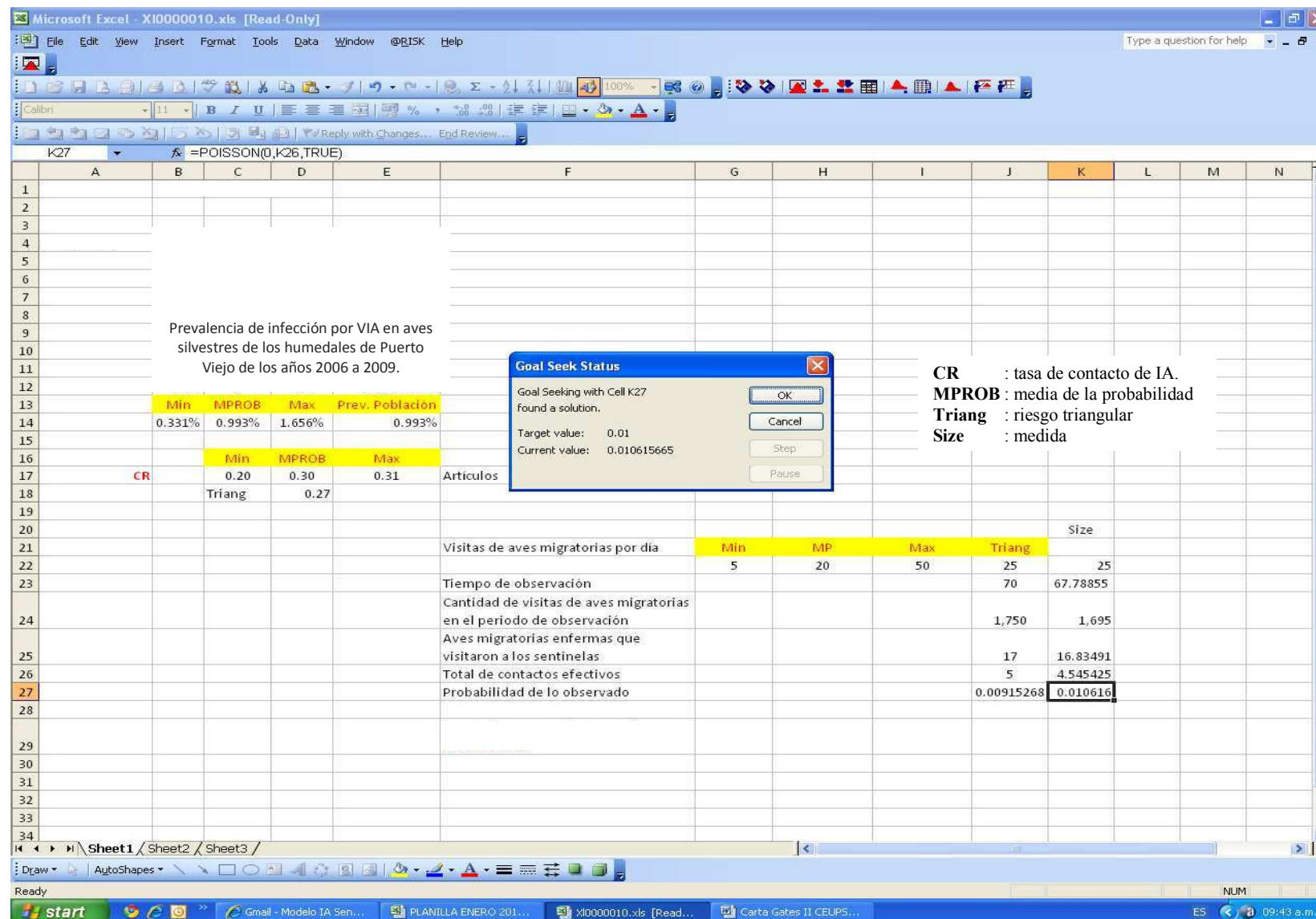
	Resultado					
	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42	Día 56	Día 70
Anticuerpos	Neg.	-	Neg.	-	Neg.	Neg.
Aislamiento viral	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

4.2.2 Resultado de la inoculación de huevos embrionados para el aislamiento viral

- No se detectaron lesiones de ningún tipo en los embriones inoculados con las muestras de hisopado cloacal, en el primero ni en el segundo pasaje.
- En ningún caso se observó actividad hemaglutinante del fluido alantoideo de dichos embriones, siendo negativos al aislamiento viral, aun cuando uno de embriones presentó una ligera disminución de su tamaño al primer pasaje pero no al segundo pasaje.

4.3 Modelo Estadístico de los datos

Tabla 03. Aplicación de la prueba de Goal Seeking en los datos obtenidos del estudio



V.- DISCUSIÓN

Las aves silvestres migratorias han sido reconocidas como reservorios predilectos de los VIABP, y en algunos casos también de los VIAAP sin manifestar signos clínicos (Linzito *et al.*, 2005); además existe evidencia científica de que juegan un papel importante en la transmisión del virus a las aves domésticas; no obstante no se conocen a fondo los mecanismos de transmisión de los virus presentes en aves silvestres a las poblaciones de aves domésticas (FAO, 2007b; Beldoménico y Uhart, 2008).

Las aves silvestres migratorias que portan los VIABP pueden diseminarlos a granjas de aves comerciales como ha ocurrido en diversas partes del mundo y pueden producir diversos cuadros de la enfermedad (NABC - Kansas University, 2009); favoreciendo el mantenimiento y emergencia de nuevas cepas potencialmente patógenas a través de la mutación o recombinación genética (Corporación Ornitológica del Ecuador y Birdlife International; Health Day, 2008), tal como lo reporta Capua y Marangon, (2006a) en aves domésticas de Europa.

Los VIABP son endémicos en aves silvestres en todo el mundo y esto hace que sea imposible clasificar a las poblaciones de aves silvestres libres de la infección (International Program Committee for the Sixth International Symposium on Avian Influenza, 2007). Por otra parte algunos autores como Slemons *et al.*, (2003); Espinal, (2007) y Kang *et al.*, (2009) mencionan que si bien estas aves silvestres pueden ser fuentes de diseminación, en su mayoría por ser asintomáticas a la infección, son responsables de la dispersión de los VIABP. Esto ocurre peculiarmente con las especies de patos y gansos (Capua y Marangon, 2006a).

El hallazgo de los VIAAP probablemente producto de cambios antigénicos de los VIABP en Chile y en los 3 países de Norteamérica (los cuales colindan con el corredor de la ruta del Pacífico) en los últimos años (FAO, 2007e); hizo justificable en nuestro estudio la aplicación del tipo de vigilancia dirigida en poblaciones de riesgo de aves silvestres migratorias y residentes de lugares estratégicos como son la playa y humedales de Puerto Viejo; por el riesgo existente en la dispersión de los VIA a las aves de crianza comercial ubicadas en granjas cercanas a dichos lugares, enfatizando la necesidad de monitorear aves silvestres y domésticas para detectar la presencia de los VIA.

La FAO señala que es importante monitorear los virus de campo para su detección temprana mediante el muestreo sistemático de aves durante períodos epizooticos e interepizooticos para enviar muestras sospechosas al laboratorio de referencia, para su confirmación y posterior caracterización (Martin *et al.*, 2007). Por lo tanto esta investigación ofrecería un panorama a la vigilancia efectiva en países libres que quieren detectar tempranamente la incursión de los VIA en sitios de alto riesgo o en situaciones donde existe peligro de infección en sus aves silvestres tal como lo señala Vargas, (2003).

Esto conlleva a evaluar preferentemente **la aparición de formas no patógenas** en países donde los VIA nunca han sido detectados y prevenir su propagación en zonas no afectadas, debido a la posibilidad potencial de aparición de formas muy patógenas (FAO, 2007c). El presente estudio contribuye a conocer la ecología y la epidemiología de los VIA, con miras a elaborar programas de control para contener la circulación del virus e impedir la re-infección tal como lo menciona la OIE (2005).

La centinelización usando patos, para la detección temprana de la infección por VIA fue usada desde inicios de los 80s (Sinnecker *et al.*, 1982 y Halvorson *et al.*, 1985). Posteriormente el USDA en el 2006; reportó que el uso de patos centinelas en colonias de aves silvestres, mejoró la tasa de detección viral en cinco veces más comparado a la detección directa de los virus en aves silvestres, esto sugirió que este enfoque tiene sus ventajas para los estudios ecológicos de la enfermedad.

Igualmente los patos centinelas han sido usados para calcular la infección asociada con el arribo de aves acuáticas migratorias silvestres a humedales adyacentes a granjas comerciales de producción de pavos (USDA, 2006). Según Keawcharoen *et al.*, (2008) se considera apropiado el uso de patos domésticos como centinelas a diferencia de otras especies silvestres como los patos mallard, porque estos últimos no solo pueden actuar como reservorios de VIA, también pueden dispersarlos a grandes distancias.

El uso de esta especie doméstica como centinela es altamente valioso debido a su mayor susceptibilidad a la infección, pudiendo comportarse como reservorio asintomático, lo que es apropiado como método de vigilancia para la detección temprana de la infección, tal como lo indican Martin *et al.*, (2007) y la OIE, (2008). Además permite evaluar la presencia de virus en lugares donde las especies silvestres que pueden ser reservorios conocidos se congregan o donde hay especies de aves silvestres residentes que pudieran haber sido expuestas previamente a los virus (Ver tabla 02).

Aun cuando las aves silvestres residentes no migratorias presentes en el lugar de estudio (Patos Mallard y gansos domésticos), también pudieron haber representado el mismo rol que las patos centinelas utilizados, tal como lo mencionó Slemons *et al.*, (2003); estas no fueron usadas debido a las dificultades que se presentan para manejarlas, capturarlas y observarlas, haciendo improcedente su seguimiento. Por otra parte el tamaño muestral se basó en la suposición que la prevalencia del virus circulante fuera al menos de 1%, (por su rápida dispersión a nivel mundial en años previos); sin embargo la prevalencia pudo ser más baja, por lo tanto para compensar esta posibilidad y asegurar un mayor grado de interacción entre los patos centinelas y las aves silvestres, se prolongó el tiempo de evaluación (Ver apéndice 3.2.1.2 en la sección III).

Según García, (2009), una ventaja adicional en el uso de aves centinelas para la detección temprana de VIA, es que esta metodología podría ser hecha conjuntamente con otros métodos de vigilancia en la misma localización (Ver apéndice 2.16 de la sección II). En nuestro caso, la aplicación de esta metodología no presentó mayores inconvenientes, sin embargo se pueden mencionar algunas posibles desventajas en su aplicación:

- Requerimiento de biólogos expertos en vida silvestre para el reconocimiento de las especies de aves silvestres presentes.
- Dificultad en conseguir patos libres de IA para su uso como centinelas.
- Dificultad en la construcción de jaulas y domesticación de las aves, cuando se usan patos mallard.
- El grupo de aves centinelas puede ser sujeto de prelación por parte de la fauna silvestre.

Cabe señalar que la aplicación de esta metodología de vigilancia cumpliría y respetaría lo señalado por Whitworth *et al.*, (2007) en cuanto a la conservación y menor perjuicio de la fauna silvestre, ya que con el uso de patos domésticos se minimiza el estrés del **muestreo directo** producido por la sujeción, captura y manipulación en la toma de muestras de las aves silvestres, o por las consecuencias del **muestreo indirecto** (a través de colección de heces frescas) para aislamiento viral, que comúnmente ocasiona su dispersión (Stallknecht *et al.*, 2003; Delaware Bay, USA).

Con todas estas consideraciones se realizó la vigilancia dirigida en los humedales de Puerto Viejo que albergan una gran variedad de aves silvestres acuáticas residentes temporales y permanentes, con el fin de detectar tempranamente la presencia de los VIA, que pueden estar circulando en las aves residentes de dicho lugar, albergándose en los reservorios por mucho tiempo asintóticamente tal como lo señala Capua *et al.*, (2004). Asimismo este estudio fue el inicio y forma parte de un estudio más amplio de vigilancia de los VIA en aves silvestres residentes en la costa central del país.

El estudio se realizó entre los meses de junio a agosto del año 2006, año en el que se produjo el mayor número de casos y mortalidad por el virus H5N1 en el continente asiático (OIE, 2009), y a su vez año en que se conoció el importante rol de las aves silvestres en su diseminación. La presencia de aves domésticas de crianza comercial ubicadas en granjas cercanas distantes a menos de 3 km de los humedales de Puerto Viejo, motivó a la realización del presente estudio con el modelo utilizado (ver apéndice 3.2.1.2 de la sección III); considerando que las aves migratorias pueden llegar a los humedales esparciendo los virus que ellas portan, transmitiéndolo a las aves residentes, las que a su vez pueden infectarse y transmitirlos a las poblaciones de aves domésticas cercanas, tal como lo señala Shortridge y Melville, (2006).

El aporte de esta investigación fue mayor debido a que se buscó determinar indirectamente la presencia de los virus en aves residentes en épocas de no migración, **demonstrando la probabilidad de su dispersión a las aves domésticas de granjas cercanas, lo cual es posible de suceder durante todo el año**, tal como lo menciona Beldoménico y Uhart, (2008); considerando que las investigaciones demuestran que la transmisión de los VIABP a las aves silvestres residentes se produce durante todo el año (Gheri *et al.*, 2009).

Los factores de riesgo considerados importantes en la elaboración de este estudio tales como; el contacto entre especies de aves silvestres portadoras conocidas (de acuerdo a las referencias) y las aves susceptibles, el uso de la misma fuente de agua o de alimento entre las aves centinelas y silvestres; el contacto con las aves migratorias residentes (a través de revolcaderos para su acicalamiento); y su permanencia en las aguas estancadas (Ver además apéndice 4.1.2 de la sección IV), también son referidos por algunos autores (Martin *et al.*, 2007; Wetlands International Globalsite, 2007; NABC-Kansas University, 2009).

En el estudio, los resultados de la evaluación del comportamiento e interacción entre las aves centinelas y silvestres, mostraron la existencia de una rápida adaptación a estas condiciones de estudio, lo que permitió obtener valiosa información sobre las especies migratorias presentes en el lugar que pueden dispersar los VIA y su interacción con las aves

centinelas (Tabla 01). Esto puede considerarse en las medidas de vigilancia y prevención de IA a está y otras regiones, tal como lo menciona la FAO, (2007*d*).

Aunque la evaluación clínica se realiza a especies que tengan probabilidades de manifestar signos clínicos claros (por ejemplo pollos), existe la posibilidad de que ciertas cepas virales puedan producir signos clínicos en patos. Consecuentemente los resultados a la evaluación clínica fueron negativos, demostrando a que si bien los patos domésticos son una especie muy susceptible a la infección, es la que menos presenta una sintomatología de la enfermedad (Wetlands International, 2007). Tampoco se observó una sintomatología respiratoria leve probablemente compatible con la infección con VIAAP tal como lo reporta NABC- Kansas University, (2009).

El diagnóstico de laboratorio se realizó de acuerdo a los procedimientos sugeridos por la OIE; que incluye la identificación del agente; mediante inoculación de huevos embrionados SPF, seguida por la demostración de la actividad hemaglutinante en el fluido alantoideo y, la demostración de presencia de anticuerpos a los VIA tipo A en el suero por la prueba de AGID. Sin embargo la determinación del subtipo y la evaluación de la virulencia de la cepa (IPIV) no se realizaron, debido a la negatividad en los resultados preliminares (Tabla 02).

Según la OIE (2008), la prueba de AGID detecta anticuerpos contra la NP/M del virus en pollos y pavos, pero no en las demás especies de aves; sin embargo algunos investigadores la usaron y la consideran para descartar anticuerpos contra VIA en patos. No obstante según la FAO (2007*b*), el diagnóstico definitivo de la infección por VIA en patos se alcanza mediante el aislamiento viral por inoculación en huevos embrionados SPF de muestras de heces proveniente de hisopados cloacales, ya que los VIA replican en el intestino de patos, usualmente sin producir enfermedad detectable y excretan los virus en altas cantidades en las heces (Bunn, 2004).

Los resultados obtenidos de la evaluación en laboratorio se describieron en la Tabla 02, y verifican la información que se dispone hasta la actualidad sobre la fauna silvestre, que parece desempeñar un papel relativamente menor en el mantenimiento y propagación de esta enfermedad tal como lo menciona la FAO, (2007*e*); por el contrario existe el riesgo de que sea introducida a la avicultura comercial a través de otros grupos de aves infectadas en otros períodos de tiempo, productos avícolas o fómites contaminados tal como lo refiere Martin *et al.*, (2007).

Los resultados negativos en la detección de anticuerpos en los patos centinelas pudieron indicar la ausencia real de la exposición a los VIA, una baja producción de anticuerpos en esta especie o una baja sensibilidad en la detección de anticuerpos por la AGID

tal como lo señala Swayne y Halvorson, (2003) (Ver tabla 02); no obstante algunas referencias indican que esta prueba es la más apropiada como tamiz para detección de anticuerpos conjuntamente con el aislamiento viral como prueba confirmatoria en esta especie, antes de aplicarse otras metodologías (FAO, OIE- CFSPH-IICAB, 2009).

Los resultados negativos en el aislamiento viral, indican que la transmisibilidad de los VIA a aves centinelas fue nula, esto sugiere:

1. Que la prevalencia a la infección por los VIA puede variar grandemente acorde a la estación y localización, debido a especies individuales y sus poblaciones exhibiendo diferente comportamiento, hábitos y, rangos geográficos; desempeñando distintos pero importantes roles en la epidemiología de los VIA tal como lo reporta Stallknecht y Brown, (2007).
2. Que los virus tienen limitada actividad para sobrevivir fuera del hospedero, y que la persistencia en el ambiente es altamente dependiente de la humedad, temperatura y salinidad tal como lo reporta Whitworth *et al.*, (2007).

De los resultados de inoculación de los huevos embrionados SPF negativos, podemos decir que si bien no hubo alteración alguna en los embriones después la inoculación y al momento de la evaluación, excepto una ligera disminución en el tamaño en uno de los embriones, sin embargo esto no es un indicio para considerarlo como positivo, ya que este embrión murió un día antes de finalizar el periodo de incubación; además que el fluido alantoideo fue negativo a la prueba de HA hasta el segundo pasaje.

Estos resultados concuerdan cronológicamente con lo hallado por Slemons *et al.*, (2003), en aves centinelas en el estado de Maryland (EEUU) en el punto de mayor convergencia de aves silvestres en el Atlántico, en la fase previa a la migración anual de aves silvestres hacia el sur (julio - agosto) donde los resultados fueron negativos; a diferencia de los resultados positivos en la fase inicial de migración anual. Se pudo evidenciar que los patos residentes pudieron jugar un rol activo en la diversidad antigénica de los VIA por su interacción, y que su uso como centinelas para la detección temprana fue muy importante pese a los riesgos que existieron en la perpetuación de los virus durante y posterior al estudio.

Por otra parte las suposiciones con respecto a la estacionalidad de la transmisión de los VIA, no son claras aún. La transmisión y mantenimiento de los virus en poblaciones de patos de vida libre compromete múltiples interacciones entre varias especies hospederas, muchos subtipos virales y ambientes. Asimismo Hanson *et al.*, (2005), no encontraron una asociación entre la prevalencia de infección y la estación del año en norte América.

Los resultados de esta investigación se contrastan con lo referido por Blanco, (2009) quien señala que existe baja probabilidad de transmisión de los VIA por parte de estas especies puente u hospederos intermediarios; reforzando la teoría de que el papel de las aves silvestres en la transmisión de VIA a aves domésticas es todavía incierto bajo ciertas condiciones (Spackman *et al.*, 2007); y que la probabilidad de la llegada de la cepa asiática H5N1 a Sudamérica es casi nula.

También se demuestra que la probabilidad de transmisión de los VIA por las especies comunes de aves migratorias cercanas, como las del género Passeriformes (gaviotas, garzas o palomas), que frecuentan las zonas adyacentes a establecimientos de producción avícola y los patios de las casas es baja; sin embargo deben considerarse en la eco epidemiología de la enfermedad, tal como lo menciona Beldoménico y Uhart, (2008), debido a que los brotes siguen apareciendo en granjas de aves esporádicamente en varias partes del mundo, lo que sugiere investigar si estas actúan como vectores en la transmisión de los virus y su dispersión geográfica (Whitworth *et al.*, 2007; FAO 2007d).

Otros investigadores señalan que las aves silvestres no se deben desestimar como agentes portadores del virus (Bird life International, 2005; Rose *et al.*, 2007); debido a que estas poblaciones son una ruta potencial para la introducción de los virus (sobretudo VIABP), tal como lo mencionan la Convención Ramsar, (2005) y Health Day, (2008); teniendo en cuenta por ejemplo que la mayoría de aislamientos virales en Norte América han ocurrido en patos chapoteros silvestres, asociados con hábitats localizados cerca zonas pobladas por humanos, ganado y otras especies de aves acuáticas tal como lo menciona Stallknecht, (1998).

Los factores de riesgo probables para la transmisión de los VIA a las aves centinelas, fueron considerables en el estudio (presencia de grupos de aves silvestres residentes migratorias y no migratorias en los humedales, cercanía de una playa colindante a los humedales habitada por varias especies de aves costeras presentes durante el periodo de evaluación, tránsito de personas en el trayecto de la salida de los humedales a la carretera, y la presencia de un Cormorán muerto en el lugar en una de las lagunillas habitadas por las aves centinelas a los 15 días del inicio del periodo de evaluación). Así mismo esta metodología también cumple con lo mencionado por la FAO y OIE, quienes sugieren que los estudios de vigilancia de la enfermedad deben enfocarse a identificar los factores de riesgo en la potencial transmisión de los virus en aves silvestres, en aves comerciales, de aves silvestres a comerciales, de aves comerciales a silvestres y de otra forma; ya que pueden tener una fuerte influencia en la epidemiología de la IA en estas condiciones naturales; tal como lo menciona Zegarra, (2009).

Por otra parte el análisis del agua y materia fecal en el hábitat de las aves silvestres acuáticas pueden dar evidencia de los virus que circulan entre sus poblaciones, los subtipos específicos, los niveles de patogenicidad y los posibles riesgos para las aves de corral y otros animales susceptibles tal como lo señala el USDA, (2007).

Durante el estudio, la temperatura ambiente en los humedales fue de 15 a 17 °C en promedio, valores que permiten que el agua pueda actuar como reservorio para la perpetuación de los virus, tal como lo reporta Webster *et al.*, (1992) y Alexander, (2006). Según Stallknecht *et al.*, (1990) las concentraciones virales infectivas pueden ser mantenidas hasta 207 días a 17°C y hasta 102 días a 28°C; y según la CFSPH/ IICAB / OIE, (2009) los virus persisten en agua dulce durante 100 días o más a temperaturas iguales o inferiores a 17°C, y aproximadamente 26 a 30 días a 28°C. No obstante a pesar de haberse reconocido la importancia de la transmisión oral/fecal en poblaciones de aves silvestres, existen datos de que su persistencia en agua es extremadamente limitada (Stallknecht y Brown, 2007).

El estudio aportó al entendimiento de la diseminación de los VIA a la avicultura comercial; sin embargo relativamente poco se sabe acerca de su ecología en aves silvestres, la profundidad de los datos son inconsistentes en todo el mundo (Spackman, 2009). Se debe seguir con la vigilancia científica y monitoreo de aves silvestres, sobretodo para identificar individuos portadores que pueden estar circulando en los humedales (International Program Committee for the Sixth International Symposium on Avian Influenza, 2007).

Por tanto el riesgo de dispersión de los VIA a las aves centinelas durante el estudio fue posible teniendo en cuenta la presencia de poblaciones de aves silvestres que son portadoras de VIA para el caso de Sudamérica (Ver Cuadro 05 de la sección II). A pesar de que las poblaciones de aves silvestres que intervinieron y tuvieron contacto con las aves centinelas fueron pocas, algunas de estas especies fueron conocidas de ser portadoras de los VIA (Ver tabla 01).

El tiempo de evaluación de las aves centinelas fue de 70 días, período considerado suficiente para evaluar la transmisibilidad de los virus proveniente de las aves silvestres residentes debido a que los resultados con el procesamiento de los datos con la prueba Goal Seeking demostró estadísticamente que el tiempo necesario para el inicio de la presentación del evento (probabilidad $\geq 1\%$ de trasmisión del virus e infección de las aves centinelas) con una probabilidad estadística del 99%, fue de 68 días (Ver cuadro 03 de la sección IV).

El tiempo de evaluación no se extendió a más de 70 días, por dos motivos:

1. Porque las aves centinelas llegaron a un mayor grado de interacción con las aves silvestres residentes del lugar durante el período de estudio (estación de

invierno); dispersándose a zonas alejadas de los humedales lo que dificultaba su apropiado seguimiento.

2. Por la cercanía de áreas urbanas en los humedales, que comienzan a poblarse desde el mes de setiembre - octubre, lo que hubiera condicionado al mayor contacto entre las aves centinelas con los pobladores; teniendo en cuenta que estas pueden ser reservorios asintomáticos de cepas altamente patógenas como la H5N1, tal como lo señala Sturm - Ramírez *et al.*, 2005 y CENAVECE; representando un serio riesgo para la salud pública y animal.

La tasa de contacto considerado en el modelo estadístico para la IA (entre 20 y 30%), este valor fue considerado para la aplicación de la prueba Goal Seeking en la estimación del suceso para el evento (probabilidad de contagio por VIA a las aves centinelas en un periodo de tiempo), considerando la rápida difusión de virus en ambientes naturales y poblaciones de aves silvestres. Así mismo se debe considerar el comportamiento gregario de los patos usados como centinelas, la alta susceptibilidad de la especie a la infección por VIA (5 veces más sensible que otras especies) y, el tiempo de permanencia en el lugar de observación (lugar de alojamiento y dispersión de aproximadamente 90 hectáreas), en la laguna y alrededores.

Los valores de prevalencia de la infección por VIA tomados en el modelo estadístico (Tabla 03), puede reflejar un valor real en el área teniendo en cuenta la prevalencia del virus en el 2006 y en años posteriores de acuerdo a la detección de genotipos bajamente patogénicos en la zona durante todos los periodos del año (Gherssi *et al.*, 2009; Icochea, datos no publicados), a pesar de que inicialmente se tomó una prevalencia general de la infección por VIA en aves silvestres (Olsen *et al.*, 2006).

Los datos finales obtenidos también concuerdan con otras investigaciones relacionadas sobre la infección por los VIA en aves comerciales y silvestres en la costa central del país (Monasi e Icochea, 1999; Muñoz, 2000 (datos no publicados)); y complementó a los esfuerzos que realizaron otras entidades estatales para detectar factores de riesgo en la introducción de los virus y prevenir su dispersión a las aves de corral de crianza comercial y casera.

Cabe señalar que estos resultados provienen de una evaluación en condiciones de campo, donde las investigaciones reportan una persistencia viral por tiempos prolongados en patos infectados naturalmente, y una evaluación periódica en laboratorio de 14 días como mínimo; estos no se correlacionan con los hallazgos de Brown *et al.*, (2006), quienes produjeron infección experimental por inoculación de VIAAP H5N1 en tres especies de patos norteamericanos (*A. platyrhynchos*, *Anas crecca*, *Anas acuta* y *Aythya americana*) sin producirse enfermedad o muerte, aunque el virus sólo se aisló de ellos por poco tiempo (1-4

días); no obstante en otra especie de ave se pudo aislar virus durante mas tiempo (Brown *et al.*, 2008).

A pesar de los grandes esfuerzos de vigilancia con la excepción de unos pocos casos reportados de IAAP (H5N1) en patos silvestres aparentemente sanos, la evidencia del compromiso de aves silvestres en la dispersión de los VIAAP (H5N1) a grandes distancias es aún carente tal como lo indica Gaidet *et al.*, (2008). Todos los brotes de IAAP antes mencionados para las Américas se circunscribieron a granjas y en ningún caso se detectó propagación inmediata a aves silvestres. Sin embargo, un virus H7N3 filogenéticamente relacionado al que causará el brote del 2002 en Chile fue aislado en una cerceta colorada (*Anas cyanoptera*) en Bolivia en 2001 (Spackman *et al.*, 2006).

La aplicación de esta metodología también aportó a la prevención de la enfermedad, tal como lo indica la FAO, OIE y OMS, quienes señalan que deben considerarse un diagnóstico temprano de cualquier infección, para tomar decisiones zoosanitarias adecuadas previamente planeadas en diferentes escenarios, con recursos económicos y humanos para hacer frente a la contingencia. Los ejercicios de simulación son claves, para identificar vacíos en o sobre posición de las responsabilidades durante un brote (Martin *et al.*, 2007).

La biología de los VIA es importante por su gran adaptación a diferentes hospederos y probablemente también al ambiente (Spackman E, 2009). La información de cómo los virus son mantenidos, transmitidos y desplazados a través del ambiente proveerá información valiosa sobre evaluaciones de riesgo para la salud humana y animal. Según Clark y Hall, (2006), las vías de contagio (p. ej.: la forma en que el virus pasa de las aves acuáticas a las aves domésticas o viceversa) continúan sin entenderse y deben ser sujetas de futuras investigaciones. La vigilancia de los virus proveen oportunidad para incrementar nuestro entendimiento no solo en la epidemiología de la IAAP sino también en la ecología de los VIABP en su hospedero natural, al mismo tiempo y costo (Fouchier *et al.*, 2007).

Los resultados negativos en esta vigilancia, sumados a otras investigaciones realizadas por otras instituciones del país, refuerzan la teoría del mínimo rol que ejercerían estas poblaciones en la transmisión de los VIA a las poblaciones de aves comerciales colindantes a los humedales; contrarias a la teoría de que la proximidad de los humedales de la Costa Central del Perú a hábitats humanos, granjas de porcinos y pollos podrían representar un riesgo para la transmisión de VIA de aves silvestres a la avicultura, a la población humana y porcina, tal como lo afirman Gherzi *et al.*,(2009).

Con estos resultados también se refuerza la hipótesis planteada en un trabajo paralelo realizado por Gherzi *et al.*, (2009), quienes mencionan que la transmisión de los VIA mas

fácilmente se produce de forma unidireccional de las aves migratorias del norte del continente a las aves no migratorias residentes, por períodos cortos y directos de interacción, y no ocurre de la misma forma hacia las aves domesticas como son las aves centinelas utilizadas en el presente estudio; sin embargo como se mencionó, un mayor tiempo de evaluación y un mayor grado de interacción pudo haber tenido resultados diferentes pero de alto riesgo por la dispersión de los virus al ambiente.

Probablemente las aves centinelas se hubieran infectado al exponerse a las especies reservorios durante períodos mas prolongados o durante los periodos de más alta eliminación viral; sin embargo también cabe señalar que la presencia de aves acuáticas silvestres residentes permanentes en el lugar (incluyendo un grupo de 6 Patos Mallard y otro de gansos domésticos), que interactuaron previamente con las aves silvestres de los humedales 6 meses previos al inicio del estudio, nos permite inferir que la transmisión horizontal de los VIA de aves silvestres a domesticas no se produce con facilidad.

Cabe señalar que los VIA estuvieron dispersos en las poblaciones de aves silvestres en los humedales de Puerto Viejo, ya que los resultados del trabajo de vigilancia en toda la Costa Central reportan que 8 de los 22 aislamientos de VIABP provinieron de este lugar (Icochea, comunicación personal); sugiriendo la importancia en el desarrollo de este estudio. Asimismo los resultados demuestran que la probabilidad de dispersión de los VIA por las aves silvestres migratorias y residentes a las granjas de aves comerciales en zonas circundantes al lugar de estudio es nula en épocas de bajas migraciones.

Por otra parte la relevancia del estudio es aún mayor porque la aplicación de esta metodología de detección temprana de los VIA, también sirvió para el caso de los virus de subtipo H5 y H7 que han revertido su patogenicidad como en el caso de la cepa asiática de subtipo H5N1 que se dispersó a través de migraciones de aves silvestres desde Asia hasta Europa y África, que también fue hallado en Norte América aunque fue bajamente patógeno (OIE, 2009), o como en el caso del virus de subtipo H7N3 el cual revertió su patogenicidad y afecto a aves comerciales en Chile, donde todos los indicios muestran que fue transmitido por aves silvestres (PIC y OCHA, 2010).

Los resultados no sugieren la exclusión de aplicación de prácticas correctas de manejo en bioseguridad efectiva a nivel de granjas para prevenir la introducción de aves silvestres. Probablemente el monitoreo de muestras de agua o materia fecal recogidas en el hábitat de las aves acuáticas podría haber sido un medio razonablemente más productivo donde se pueda lograr en términos tecnológicos una mejor evaluación de los riesgos en las aves tal como lo señala el USDA, (2007); porque en la medida que los humedales y playas de importancia para

aves migratorias se vean intervenidos por actividades antrópicas, las aves se ven obligadas a modificar sus áreas habituales de descanso y dispersarse hacia otros sectores (Tala, 2006).

La vigilancia también debe enfocarse en reforzar el seguimiento de la enfermedad en especial en países de riesgo, un mejor control de los mercados de aves y el transporte de aves de corral, con reducción del contacto directo entre personas, aves de corral y aves silvestres; con mejores prácticas de manejo y bioseguridad en establecimientos avícolas tal como lo indica CENAVECE y Wetlands International Globalsite, (2007); debido a que más allá de los patrones de migración de las aves silvestres, también se debe tener en cuenta que en el actual mundo globalizado, el mayor riesgo de traslado de VIA es a través del comercio y tráfico internacional de aves, subproductos, o agentes expuestos a estos (Kareesh *et al.*, 2007).

Lamentablemente, se conoce muy poco sobre la actividad de los VIA en Sudamérica, ya que hasta el presente los datos de vigilancia han sido mínimos (Escudero *et al.*, 2008). No obstante este trabajó contribuyó con el programa de la “Red Mundial de Vigilancia Epidemiológica de Influenza Aviar en Aves Silvestres” (GAINS), que se llevó a cabo en varios países de Sudamérica y con los esfuerzos de vigilancia en los países integrantes se contó con información vital para ampliar nuestro conocimiento sobre la eco epidemiología de VIA en nuestra región (Beldoménico y Uhart, 2008).

Finalmente la vigilancia de la IA en situaciones reales de estudio debe disponer un trabajo multidisciplinario con profesionales formados en medicina, epidemiología, virología, zoología y veterinaria, por la gran interrelación de factores; asimismo debe tenerse en cuenta que las vías de transmisión no solo son por animales sino por movimientos comerciales tanto legales como ilegales tal como lo señala Rodríguez *et al.*, (2009).

VI.- CONCLUSIONES

- El comportamiento de las aves centinelas respecto al lugar de alojamiento mostró una rápida adaptación y su interacción con las aves silvestres de los humedales fue moderado.
- Los resultados negativos obtenidos en las evaluaciones realizadas bajo las condiciones y tiempo que duro el estudio, sugieren la ausencia del VIA en las poblaciones de aves silvestres y que la transmisión horizontal de los virus a las aves domésticas fue difícil.

VII.- RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de vigilancia directa de los VIA en aves silvestres que habitan humedales cercanos a donde se encuentran las poblaciones de aves domésticas, sobretodo las de crianza casera.
- Realizar investigaciones adicionales para dilucidar algunos aspectos de eco epidemiología de los VIA en aves silvestres sobretodo en los humedales cercanos a las granjas de aves comerciales; para considerar óptimamente actividades de vigilancia y prevención de la enfermedad a nuestras condiciones.
- Elaborar programas de vigilancia sostenible sobre el riesgo de transmisión de los VIA destinados a las aves de corral, para identificar tempranamente su presencia y elaborar estrategias rápidas de mitigación y eliminación.
- Realizar estudios similares de vigilancia dirigida a nuestras condiciones geográficas con un mayor tiempo de duración y, en períodos cuando existen mayores poblaciones de aves silvestres producto de las mayores migraciones longitudinales.

VIII.- BIBLIOGRAFIA CITADA

1. **Abolnick C, Bisschop R, Olivier A, Homer R. 2006.** Phylogenetic analysis of low pathogenicity Avian Influenza H6N2 virus from chicken outbreaks (2001-2005) suggests that they are reassortants of historic ostrich Low-Pathogenicity Avian Influenza H9N2 and H6N8 viruses. *Avian Dis* 51: 279-284.
2. **Abolnik C. 2007.** Detection of a North American lineage H5 avian influenza virus in a South African wild duck. Onderstepoort. *J Vet Res* 74: 177-180.
3. **Acuy YM, Pulido CV. 2007.** Perú: informe anual. Censo Neotropical de Aves Acuáticas 2006. Grupo de aves del Perú - GAP. En: Lesterhuis AJ, Blanco DE. eds. *El Censo Neotropical de Aves Acuáticas 2006. Una herramienta para la conservación.* Wetlands International. Buenos Aires, Argentina. <http://lac.wetlands.org/>. [Internet], [19/07/2009]. Disponible en: <http://lac.wetlands.org/LinkClick.aspx?fileticket=DtaHrjVozVg%3D&tabid=1570&mid=6146>
4. **Agencia Peruana de Noticias. ANDINA. 2009.** SENASA descarta la existencia de la Gripe Aviar en el Perú. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://www.andina.com.pe/espanol/Noticia.aspx?id=5w1mQG/s9yw=>
5. **Agüero M, Sánchez A, Jiménez-Clavero M, Gómez-Tejedor C. 2006.** A real-time Taq Man RT-PCR method for Neuraminidase type 1 (N1) gene detection of H5N1 Eurasian strains of Avian Influenza Virus (AIV). *Avian Dis* 51(s1): 378-381.
6. **Alexander DJ, Spackman DE, Gough RE, Borland ED, Stuart JC. 1981.** Isolation of Influenza A viruses from commercial ducks on a farm in Norfolk between August 1979 and March 1980. *Avian Pathol* 10: 263-272.

7. **Alexander DJ, Parson SG, Manvell RJ. 1986.** Experimental assessment of the pathogenicity of eight avian influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail. *Avian Pathol* 15:647-662.
8. **Alexander DJ. 2000.** A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiology* 74 (Iss. 1-2): 3-13.
9. **Alexander DJ. 2003.** Report on avian influenza in the eastern hemisphere during 1997–2002. *Avian Dis* 47: 792–797.
10. **Alexander DJ. 2006.** Summary of Avian Influenza Activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia, 2002–2006. *Avian Dis* 51(s1): 161-166.
11. **Alexander DJ. 2007a.** An Overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25: 5637-5644.
12. **Alexander DJ. 2007b.** Gripe Aviar. Enfermedad y diagnóstico. Sección de Virología, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET), Fac. de Microbiología, Univ. de Costa Rica. Laboratorios de Referencia para la C.E., OIE, y FAO para la Gripe Aviar. Veterinary Laboratories. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
http://www.oie.int/ESP/normes/mmanual/pdf_es/2.1.14_Gripe_aviar_2007.pdf
13. **Asociación Latinoamericana de Avicultura.** Comunicados públicos. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://www.avicolatina.org/comu.htm#com4>
14. **Asociación Peruana de Avicultura.** Importancia de la Avicultura en el Perú. [Internet], [15/08/2010]. Disponible en:
<http://www.apavic.com/html/sections/cuadros/cuadros.asp>
15. **Arranz RJ. 2008.** Influenza aviar y seguridad alimentaria. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://ranf.com/gripe/influenza/cap09.pdf>
16. **Arzey G. 2004.** The role of wild aquatic birds in the epidemiology of Avian Influenza in Australia. *Australian Vet. Journal* 82(6): 377-378.
17. **Banks J, Speidel EC, McCauley JW, Alexander DJ. 2000a.** Phylogenetic analysis of H7 haemagglutinin subtype influenza A viruses. *Arch Virol* 145: 1047-1058.
18. **Banks J, Speidel EC, Harris PA, Alexander DJ. 2000b.** Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol* 29: 353-360.
19. **Beigel H, Farrar JA, Han M, Hayden FG, Jong HR, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S, Yuen KY. 2005.** Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N. Engl. J. Med.* 353(13):1374-1385.
20. **Beldoménico P, Uhart M. 2008.** Eco epidemiología de los virus de Influenza Aviar. *Rev. FAVE - Cs Vet* 7 (1 y 2). [Internet], [15/08/2010]. Disponible en:
http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/publicaciones/bitstream/1/468/5/fave_vet_v7_n1_2_p23_40_resumen.pdf
21. **Berrios EP. 2002.** Influenza Aviar en Chile. *Rev Tenovet.* 8(3). Dic 2002.

22. **Betakova T, Ciampor F, Hay AJ. 2005.** Influence of residue 44 on the activity of the M2 proton channel of influenza A virus. *J Gen Virol* 86 (1): 181-184
23. **Bird life International. 2005.** Las aves migratorias son víctimas no vectores de la gripe aviar. Declaración de sobre Gripe Aviar. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: http://avesdecostarica.org/ccaocr/Gripe_aviar.html
24. **Blanco DE. 2009.** Ecología y comportamiento de aves silvestres migratorias y la influenza aviar. Wetlands International- LAC. Bs As. Argentina. Taller Internacional de Vigilancia en Aves Silvestres: Herramienta Global Contra la Influenza Aviar. Santiago, 17 a 18 de junio de 2009. Organizado por el Servicio Agrícola y Ganadero; US Department of Agriculture (USDA/APHIS) y Wildlife Conservation Society (WCS). [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
[http://www.sag.gob.cl/opendocs/asp/pagVerRegistro.asp?boton=Doc49&argInstanciaId=49&argCarpetaId=1900&argTreeNodosAbiertos=\(1900\)\(-49\)&argTreeNodoActual=1900&argTreeNodoSel=1900&argRegistroId=4560](http://www.sag.gob.cl/opendocs/asp/pagVerRegistro.asp?boton=Doc49&argInstanciaId=49&argCarpetaId=1900&argTreeNodosAbiertos=(1900)(-49)&argTreeNodoActual=1900&argTreeNodoSel=1900&argRegistroId=4560)
25. **Boere GC, Galbraith CA, Stroud DA. 2006.** Waterbirds around the world. The Stationery Office, Edinburgh (Reino Unido). pp: 427- 431. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
http://books.google.com.pe/books?id=4htx09cb-6gC&pg=PA14&lpg=PA14&dq=Boere+y+Stroud,+2006+migraciones+de+aves+silvestres&source=bl&ots=HUW9_eQDCo&sig=cH7itr08ga2Z_qENlvHrjaDtLDE&hl=es&ei=-cRhTIC_EYP58Aaqlsi6Cg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBQQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false
26. **Bort C.J. y J. Ll. Bort C. 1998.** La migración de aves Grup d' Estudis i Protecció de les Rapaces (G.E.R). [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
<http://www.internatura.org/estudios/migracio.html>
27. **Bosch FX, Orlich M, Kleink HD, Rott R. 1979.** The structure of the Hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of Influenza viruses. *Virology* 95: 197-207.
28. **Bosch FX, Garten W, Klenk HD, Rott R. 1981.** Proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinins: primary structure of the connecting peptide between HA1 and HA2 determines proteolytic cleavability and pathogenicity of Avian Influenza viruses. *Virology* 113(2): 725-735.
29. **Bragstad K, Jorgensen PH, Haudberg KJ, Møllergaard S, Corbet S, Fomsgaard A. 2005.** New avian influenza A virus subtype combination H5N7 identified in Danish mallard ducks. *Virus Res.* 109(2): 181-90.
30. **Brandon L, Banks J, Alexander D. 2007.** Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in vivo tests. *Avian Pathol* 36(5): 347-350(4).

31. **Brown IH, Banks J, Manvell RJ, Essen SC, Shell W, Slomka M, Londt B, Alexander DJ. 2006.** “Recent epidemiology and ecology of influenza A viruses in avian species in Europe and the Middle East”. *Dev Biol (Basel)* 124:45-50.
32. **Brown JD, Stallknecht DE, Beck JR, Suarez DL, Swayne DE. 2006.** Susceptibility of North American Ducks and Gulls to H5N1 Highly Pathogenic. *Avian Influenza Viruses. Emerg Infect. Dis.* 12(11): 1663-1670.
33. **Brown JD, Swayne DE, Cooper RJ, Burns RE, Stallknecht DE. 2007.** Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 51: 285-289.
34. **Brown JD, Stallknecht DE, Valeika S, Swayne DE. 2007.** Susceptibility of wood ducks to H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. *J Wildl Dis.* 43(4): 660-667.
35. **Brown JD, Stallknecht DE. 2008.** Bird Surveillance for the Avian Influenza Virus. *Met Molec Biol* 436: 85-97.
36. **Brown JD, Stallknecht DE, Swayne DE. 2008.** Experimental infection of swans and geese with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) of Asian lineage. *Emerg Infect Dis* 14: 136-142.
37. **Brown JD, Stallknecht DE, Berthas RD, Luttrell MP, Velez K, Kastler W, Costa T, Easley MJ, Swayne D. 2009.** Evaluation of a Commercial Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect Avian Influenza Virus Antibodies in Multiple Experimentally Infected Avian Species. *Clin Vacc Immunol.* 16(6): 824-829.
38. **Brown JD, Luttrell MP, Berghaus RD, Kistler W, Keeler SP, Howey A, Wilcox B, Hall J, Niles L, Dey A, Kuntsen G, Fritz K, Stallknecht DE. 2010.** Prevalence of antibodies to type A influenza virus in wild avian species using two serologic assays. *J Wildl Dis* 46(3): 896-911.
39. **Bruschke C, Bruckner G, Vallat B. 2007.** International standards and guidelines for vaccination of poultry against highly pathogenic avian influenza. *Develop in Biologic (Basel)* 130: 23-30.
40. **Bunn C.M. 2004.** The role of wild aquatic birds in the epidemiology of avian influenza in Australia. *Aust Vet Journal* 82(10): 644.
41. **Buscaglia C. 2004.** Influenza Aviar. Artículo de Revisión. *Fac. Ciencias Veterinarias. Univ. Nac. De la Plata. Bs As. Argentina.* In *Vet* 2004. 6(1): 71-84.
42. **Capua I. and F. Mutinelli. 2001.** Mortality in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser* var. doméstica) associated with natural infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H7N1 subtype. *Avian Pathol* 30: 179-183.
43. **Capua I, Terregino C, Cattoli G, Mutinelli F, Rodríguez JF. 2003.** Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol* 32: 47-55.
44. **Capua I, Dennis J, Alexander J. 2004.** Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol* 33(4): 393-404(12).

45. **Capua I, Alexander DJ. 2005.** The proposed new OIE Chapter on Avian Influenza. Oficina Internacional de Epizootias y National Reference Laboratory for Avian Influenza, Instituto Zooprofiláctico. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/a_00037.htm
46. **Capua I, Alexander DJ. 2006.** The challenge of Avian influenza to the Veterinary Community. *Avian Pathol* 35(3): 189-205(17)
47. **Capua I, Marangon S. 2006a.** Control of Avian Influenza in Poultry. *Emerg Infect Dis* 12(9)
48. **Capua I, Marangon S. 2006b.** Control and prevention of avian influenza in an evolving scenario. *Vaccine* 25: 5645–5652.
49. **Capucci DT, Johnson DC, Brugh M, Smith TM, Jacson CF, Pearson JE, Senne DA. 1985.** Isolation of avian influenza virus (subtype H5N2) from chicken eggs during a natural outbreak. *Avian Dis.* 29: 1995-1200.
50. **Causey D, Edwards SV. 2008.** Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. *Avian Influenza Virus in Birds.* 197 (Suppl. 1): S29.
51. **Clark L, Hall J. 2006.** Avian Influenza in wild birds: Status as reservoirs, and risk to human and agriculture. *Ornithological Monographs.* The American Ornithologists Union, 2006. (60): 3-29.
52. **Cattoli G, Drago A, Maniero S, Toffan A, Bertoli E, Fassina S, Terregino C, Obbi C, Vicenzoni G, Capua I. 2004.** Comparison of three rapid detection system for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathol* 33(4): 432-437(6)
53. **CENAVECE.** Influenza Aviar. Se modifica el papel de los patos domésticos en Asia. México. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://www.cenavece.salud.gob.mx/emergencias/interior/flu-aviar.htm>
54. **Center for Infectious Disease Research & Policy. 2007.** Avian Influenza (Bird Flu): Agricultural and Wildlife Considerations. [Internet], [11/08/2010]. Disponible en: <http://www.cidrapforum.org/cidrap/content/influenza/avianflu/biofacts/avflu.html>
55. **Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), 2005.** Influenza aviar variante H5N1. Panel 3 Nov. 2005. Univ. De Guadalajara Dep. Med. Vet. México. CUCBA. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://www.cucba.udg.mx/vidauniversitaria/influenza/panel.htm>
56. **Commission of the European Communities. 2006.** Commission Decision of approving a Diagnostic Manual establishing diagnostic procedures, sampling methods and criteria for evaluation of the laboratory tests for the confirmation of Avian Influenza. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:237:0001:0027:EN:PDF>

57. **Committee on Foreign Animal Diseases. 1998.** Appendix 3: Cleaning and disinfection. In: Foreign Animal Diseases. U.S. Animal Health Association: Richmond. VA. 445-448.
58. **Committee on Foreign and Emerging Diseases of the United States Animal Health Association (USAHA), 2008.** Avian Influenza. Foreign Animal Diseases. 7th. Ed. PO Box 8805. St. Joseph, MO 64508. Boca Publications Group, Inc. 2650 N. Military Trail, 240-SZG. Printed in Canada. p 137-146/441-442 [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
http://www.aphis.usda.gov/emergency_response/downloads/nahems/fad.pdf
59. **Comotto GE. 2000.** Enfermedades de las aves. Influenza Aviar. 1^a ed. Lima – Perú. Ed. Sagazeta. p 157-163.
60. **Convención Ramsar sobre los Humedales. 2005.** La Gripe Aviar hiperpatogénica y sus consecuencias para la conservación y el uso racional de los humedales. 9^a Reunión de la Conferencia de las Partes Contratantes de la Convención sobre los Humedales (Ramsar, Irán, 1971) Kampala, Uganda, 8 a 15 Nov. 2005. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://www.usda.gov/birdflu>.
http://www.ramsar.org/res/key_res_ix_23_s.htm
61. **Convención sobre las especies migratorias. 2008.** Proyecto de Resolución sobre cómo responder al reto que presenta el surgimiento y resurgimiento de enfermedades en especies migratorias, incluyendo la Gripe Aviar Altamente Patógena H5N1. Distribución General. PNUMA/CMS/Resolución.9.8/ Rev.1. 28 de noviembre de 2008. Roma, del 1 al 5 de Diciembre del 2008. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: http://www.cms.int/bodies/COP/cop9/documents/meeting_docs/Res%20and%20Rec/Sp/Res_9_08_Rev3_Avian_Influenza_S.pdf
62. **Corporación Ornitológica del Ecuador y Birdlife International - Aves y conservación. Gripe Aviar. 2005.** Información General. [Internet], [15/08/2010]. Disponible en:
http://www.ambiente.gov.ec/userfiles/1/file/temas_interes/gripe_aviar.pdf
63. **Cox NJ, Fuller F, Kaverin N, Klenk RA, Lamb B, Mahy W, Mc Cauley JW, Nakamura K, Palese P, Webster RG. 2000.** Orthomixoviridae. In: Virus Taxonomy. Van Regenmortel MH., Fauquet CL., Bishop DHL., Carstens EB., Estes MK., Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, Mc Geoch DL, Pringle CR, Wickner RB. Seventh Report of the International Committee on taxonomy of viruses. Academic Press: San Diego. p: 585-597.
64. **Cox NJ, Subbarao K. 2000.** Global Epidemiology of Influenza: Past and Present. An Rev of Med 51:407-421
65. **Chan PK. 2002.** Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. Clin Infect Dis 34 (Suppl 2): S58- S64.

66. **Chen H, Deng G, Li Z, Tian G, Jiao P, Zhang L, Liu Z, Webster RG, Yu K. 2004.** The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. PNAS. 101(28): 10452-10457. [Internet], [15/08/2010]. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/101/28/10452.abstract?cited-by=yes&legid=pnas;101/28/10452>
67. **Choi YK, Seo SH, Kim JA, Webby RJ, Webster RG. 2005.** Avian Influenza viruses in Korean live poultry markets and their pathogenic potential. Virology 332: 529-537.
68. **Cherbonel M, Lamandé J, Allec C, Schmitz A, Ogor K, Gall-Reculé G. L, Le Bras. C, Guillemoto MO, Pierre I, Picault JP, Jestin V. 2007.** Virologic Findings in Selected Free Range Mule Duck Farms at High Risk for Avian Influenza Infection. Avian Dis 51:408-413.
69. **Das A, Spackman E, Senne D, Pedersen J, Suarez DL. 2006.** Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. J. Clin. Microbiol. 44(9): 3065–3073.
70. **Davison S, Ziegler AF, Eckroade RJ. 2007.** Comparison of an antigen-capture enzyme immunoassay with virus isolation for avian influenza from field samples. J Willf Dis. 43(Sup. 3): 1-6
71. **DEFRA. 2007.** Outbreak of highly pathogenic H5N1 Avian Influenza in Suffolk in January 2007. A report of the epidemiological findings by the National Emergency Epidemiology Group, Defra 5 April 2007. [Internet], [15/082010]. Disponible en: http://news.bbc.co.uk/2/shared/bsp/hi/pdfs/20_04_07_defra_bird.pdf
72. **Del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J. 1996.** Handbook of the birds of the world. Vols. 1 and 3. Lynx Edicions, Barcelona - España (Vol. 1) p 528–628 / (Vol. 3) p 276–722. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: http://en.wikipedia.org/wiki/Handbook_of_the_Birds_of_the_World#Volume_3:_Hoatzin_to_Auks
73. **Dirección Nacional de Sanidad Animal. 2003.** Manual de procedimientos Influenza aviar altamente patógena. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección de Luchas sanitarias. Programa de animales de Granja. Influenza aviar altamente patógena. Argentina. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://www.aviculturaargentina.com.ar/sanidad/Manual%20de%20Procedimientos%20de%20Influenza%20Aviar.pdf>
74. **Donatelli I, Campitelli L, Di Trani L, Puzelli S, Selli L, Fioretti A, et al. 2001.** Characterisation of H5N2 influenza viruses from Italian poultry. J Gen Virol 82: 623-630.
75. **Drake JW. 1993.** Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. 90(9): 4171-4175.

76. **Dormitorio TV, Giambrone JJ, Guo K, Hepp GR. 2009.** Evaluation of field and laboratory protocols used to detect avian influenza viruses in wild aquatic birds. *Immunology, Health and disease. Poult Sci.* 88:1825-1831.
77. **Economic Commission for Latin America and the Caribbean (ECLAC) 2005-2006.** 113 Chapter VI Bird flu and foot-and-mouth disease: impacts and regional cooperation. *Latin America and the Caribbean in the World Economy.* [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
http://www.eclac.org/publicaciones/xml/0/26620/Chapter_VI.pdf
78. **Eisenlohr L, Gerhard W, Hackett CJ. 1987.** Role of receptor-binding activity of the viral haemagglutinin molecule in the presentation of influenza virus antigens to helper T cells. *J Virol* 61: 1375-1383.
79. **Ellis, TM, Bousfield RB, Bissett LA, Dyrting KC, Luk GS, Tsim ST, Sturm-Ramirez K, Webster RG, Guan Y, Malik Peiris JS. 2004.** Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol* 33: 492-505.
80. **Escudero G, Munster VJ, Bertellotti M. 2008.** Perpetuation of avian influenza in the Americas: Examining the role of shorebirds in Patagonia. *The Auk* 125: 494-495.
81. **Espinal C. 2007.** Influenza aviar y amenaza de una pandemia. *Rev. CES. Med.* 21(Supl. 1): 49-54.
82. **Easterday BC, Hinshaw VS, Halvorson DA. 1997.** Influenza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CV, Mc Dougald LR, Sief YM, eds. *Diseases of Poultry.* 10th ed. USA: Iowa State University Press: Ames, IA, p 583-605.
83. **Easterday, B.B., and B. Tumova. 1972.** Avian Influenza. In: Hofstad MS, Calnek BW, Hembolt CF, Reid WM, Yoder Jr. HW, eds. *Diseases of poultry,* 6th ed. USA: Iowa State University Press: Ames, IA, p 670-700.
84. **Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. 2004.** *Virus Taxonomy, Eighth Report Academic Press,* 1162 pp. *Microbiology & Immunology:* BS3035. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
<http://www.micro.msb.le.ac.uk/3035/BS3035/htlm>
85. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2004.** Expert meeting on surveillance and diagnosis of Avian Influenza in Asia, Bangkok, 21-23 Jul 2004. Guiding principles for highly pathogenic Avian Influenza surveillance and diagnostic network in Asia.
86. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2005.** El Riesgo de introducción y diseminación de Influenza Aviar. Preparándose para la Influenza altamente patógena. [Internet], [18/03/2006]. Disponible en:
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0632s/a0632s03.pdf>
87. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2006a.** Avian Influenza Control and Eradication. FAO's Proposal for a Global Programme. [Internet], [19/07/2006]. Disponible en:

- http://www.fao.org/docs/eims/upload/210731/Glo_pro_hpai_march06_en.pdf.
88. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2006b.** Gripe Aviar: Confirman el papel de las aves silvestres. [Internet], [19/05/2006]. Disponible en:
<http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/nfonddevila/Gripe%20aviar%20confirman%20el%20papel%20de%20las%20aves%20silvestres.htm>
 89. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2006c.** El control de Gripe Aviar. Guía para la prevención y control de la Gripe Aviar en la Avicultura de pequeña escala en América Latina y el Caribe. [Internet], [13/07/2007]. Disponible en:
<http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/flu-avi-fao-guia.htm>
 90. **[FAO] Food Alimentary Organization. Inforural. 2006.** El virus de la Gripe Aviar se está transformando: FAO - Inforural Internacional. Noticias 9 de noviembre de 2006. [Internet], [17/01/2007]. Disponible en:
http://www.inforural.com.mx/noticias.php?&id_rubrique=65&id_article=326
 91. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2007a.** Influenza Aviar. [Internet], [18/11/2007]. Disponible en:
<http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/aviar/epidemio.htm>
 92. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2007b.** Guía para la vigilancia que permita la detección temprana de Influenza aviar de Alta patogenicidad en América Latina y el Caribe. Conceptos y Directrices. Proyectos FAO de Cooperación Técnica.
 93. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2007c.** Asistencia de emergencia para la detección temprana de la Influenza Aviar en la Región Andina. [Internet], [13/09/2007]. Disponible en:
<http://www.rlc.fao.org/es/ganaderia/pdf/3105.pdf>
 94. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2007d.** Directrices generales y encuesta epidemiológica para la elaboración de un análisis de riesgo de influenza aviar en América Latina y el Caribe. Asistencia de emergencia para la detección temprana de la Influenza Aviar Altamente Patógena en el Caribe (TCP/RLA/3103); Centroamérica (TCP/RLA/3104); Región Andina (TCP/RLA/3105) y Cono Sur (TCP/RLA/3106). Proyectos FAO de Cooperación Técnica. Centro de Emergencia para el Control de las Enfermedades Transfronterizas de los Animales (ECTAD). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Oficina Regional para América Latina y el Caribe (FAORLC).
 95. **[FAO] Food Alimentary Organization. 2007e.** Influenza Aviar. Boletín de Enfermedades transfronterizas de los animales. Emergency Prevention System Empres. FAO División de Producción y Sanidad Animal. Jul 2004 - Dic. 2006. [Internet], [04/12/2007]. Disponible en:
<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1229s/a1229s00.pdf>
 96. **[FAO & OIE] Food Alimentary Organization & Oficina International Epizootics. 2006.** Recommendations from the FAO & OIE. International Scientific

- Conference on Avian Influenza and Wild Birds (Rome, Italy 30-31 May 2006). [Internet], [07/02/2007]. Disponible en: http://www.fao.org/docs/eims/upload/213826/AI_recommandationswildbirds.pdf
97. **Fouchier RA, Schneeberger PM, Rozendaal FW, Broekman JM, Kemink SA, Munster V, Kuiken T, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Van Doornum GJ, Koch G, Bosman A, Koopmans M, Osterhaus AD. 2004.** Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101: 1356–1361. [Internet], [21/12/2007]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14745020>
 98. **Fouchier RA, Munster VJ, Keawcharoen J, Osterhaus AD, Kuiken T. 2007.** Virology of Avian Influenza in relation to wild birds. *J Wildl Dis.* 43 (Supl. 3): 7-14.
 99. **Fumin L; Tang S, Zhao D, Zhang X, Kou Z, Li Y, Zhang Z, Yin Z, Chen S, Li S, Zhang D, Yan B, Li T. 2006.** Characterization of H5N1 Influenza Viruses Isolated from Migratory Birds in Qinghai Province of China in 2006. *Avian Dis.* 51(2): 568-572.
 100. **Fuller JC, Max KV. 2003.** Use of a sentinel system for avian influenza in Chile. Aplicación de un esquema de centinelización para Influenza Aviar en Chile. Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), Quillota, Chile. *Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary. Epidemiology and Economics.* [Internet], [09/01/2006]. Disponible en: <http://www.sciquest.org.nz>
 101. **Gaidet N, Dodman T, Caron A, Balança G, Desvaux S, Goutard F, Cattoli G, Lamarque F, Hagemeijer W, Monicat F. 2007.** Avian Influenza Viruses in Water Birds, Africa. Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier, France. Wetlands International, Wageningen, the Netherlands; Viale dell' Università, Legnaro, Italy; and Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, Paris, France. 13(4). April 2007. [Internet], [09/01/2006]. Disponible en: http://www.jwildlifedis.org/cgi/content/full/43/3_Supplement/S22
 102. **Gaidet N, Dodman T, Caron A, Balanca G, Desvaux S, Goutard F, Cattoli G, Lamarque F, Hagemeijer W, Monicat F. 2007.** Influenza Surveillance in Wild Birds in Eastern Europe, the Middle East, and Africa: Preliminary Results from an Ongoing FAO-led Survey. *J Wildl Dis* 43(Sup 3): 22-28.
 103. **Gaidet N, Newman SH, Hagemeijer W, Dodman T, Cappelle J, Hammoumi S, De Simone L, Takekawa JY. 2008.** Duck Migration and Past Influenza A (H5N1) Outbreak Areas. *Emerg Infect Dis* 14(7):1164-1166.
 104. **Gambaryan A, Yamnikova S, Lvov D, et al. 2005.** Receptor specificity of influenza viruses from bird and mammals: new data of involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virology* 334: 276-283.

105. **Gambaryan A, Svetlana Y, Dmitryi L, Alexander T, Alexander Ch, Galina P, Webster R, Mikhail M, Nicolai B. 2005.** Receptor specificity of influenza viruses from birds and mammals: New data on involvement of the inner fragments of the carbohydrate chain. *Virology* 334(2): 276-283.
106. **García M, Crawford JM, Latimer JW, Rivera-Cruz E, Perdue ML. 1996.** Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J Gen Virol.* 77:1493–504.
107. **García GJ. 2003.** Manejo de la crisis sanitaria avícola por IA con el uso de vacunas. Segundo Seminario Internacional de Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle. FMV-UNMSM. Lima - Perú 13-15 Agos. 2003.
108. **García GJ. 2006.** Influenza Aviar: Situación Mundial, Impacto en la Salud Pública y Criterios de la Organización Mundial de la Salud Animal. Oficina International de Epizootias (OIE).
109. **García GJ. 2009.** Influenza Aviar: Control Epidemiológico. FAO. Oficina Regional para Latinoamérica y el Caribe. [Internet], [15/08/2010]. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/aviar/pdf/ControlIAAP.pdf>
110. **García GJ, Ramos C. 2006.** La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Pública Mex* 48: 244-267
111. **García S.; Martínez C.; Molina S.; Sances D. y M. Tapia. 2006.** Rol de las aves migratorias en la transmisión de la Influenza Aviar. Univ. de Chile. Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Departamento de Medicina Preventiva Animal Epidemiología. [Internet], [21/12/2010]. Disponible en: https://www.u-cursos.cl/veterinaria/2009/1/DU12/1/material_alumnos/previsualizar?id_material=1003
112. **Garamszegi L, Møller A. 2007.** Prevalence of avian influenza and host ecology. *Proc.R.Soc.B* 274: 2003-2012.
113. **Gherzi BM, Blazes DL, Icochea EA, González RV, Kochel T, Tinoco YF, Sovero MM, Lindstron S, Shu B, Klimov A, Gonzales A, Mongtgomery JM. 2009.** Avian Influenza in Wild Birds, Central Coast of Peru. *Emerging Infect Dis* 15(6): 935-938.
114. **Gilbert M, Chaitaweesub P, Parakamawongsa T, Premashthira S, Tiensin T, Kalpravidh W, Wagner H, Slingenbergh, J. 2006a.** Free-grazing ducks and highly pathogenic avian influenza, Thailand. *Emerg Infect Dis* 12(2): 227-234.
115. **Gilbert M, Xiao X, Domenech J, Lubroth J, Martin V, Slingenbergh J. 2006b.** Anatidae Migration in the Western Palearctic and Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus. *Emerg Infect Dis* 12(11):1650-1656.
116. **Godoy P. 2006.** Avian influenza pandemics: a new challenge for public health. *Gaceta Sanitaria.* 20(1):4-8 Barcelona ene-feb. 2006. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/gsv20n1/editorial2.pdf>

117. **González R. A. 2006.** Plan de Acción para la Prevención y Respuesta a Influenza Aviar (IA) en Chile para el año 2006. Ministerio de Agricultura. División de Protección Pecuaria. Salud Animal e Inocuidad de los Alimentos. Gobierno de Chile. Bol Vet Oficial N° 5, I semestre 2006. 9 p.
118. **Gorman OT, Bean WJ, Webster RG. 1992.** Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 176: 75-97.
119. **Gregor M. 2006.** Bird Flu: a virus of our own hatching. New York: Lantern Books. 465 p.
120. **Guana Y, Peirisa M, Konga KF, Dyrtingb LK, Ellisb TM, Sitc T, Zhanga LJ, Shortridgea KF. 2007.** H5N1 Influenza Viruses Isolated from Geese in Southeastern China: Evidence for Genetic Reassortment and Interspecies Transmission to Ducks. *Virology*. 292(1): 16-23.
121. **Halvorson DA, Kelleher CJ, Senne DA. 1985.** Epizootiology of avian influenza: effect of season on incidence in sentinel ducks and domestic turkeys in Minnesota. *Appl. Environ Microbiol*. 49(4): 914-919
122. **Halvorson D, Capua I, Cardona C, Frame D, Karunakaran D, Marangon S, Ortali G, Roepke D, Woo-Ming B. 2003.** The Economics of avian Influenza. In: *Proceedings of the Fifty - Second Western Poultry Disease Conference*. March 8-11. 2003. Sacramento California. USA.
123. **Hanson BA, Stallknecht DE, Swayne DE, Lewis LA, Senne DA. 2000.** Virus de Influenza aviar en patos de Minnesota 1998-2000. *Avian Dis* 47(53): 867-871.
124. **Hanson BA, Swayne DE, Senne DA, Lobpries DS, Hurst J, Stallknecht DE. 2005.** Avian Influenza Viruses and Paramyxoviruses in Wintering and Resident Ducks in Texas. *J Wild Dis* 41(3): 624-628.
125. **Health Day. 2008.** Avian Influenza and the Pandemic threat. Las aves silvestres y la Gripe Aviar. 2008. Artículo traducido por Hispanicare TV Azteca Noreste. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
http://www.un.org/spanish/influenza/topics/wild_birds.shtml
126. **Herrero - Uribe L. 2008.** El virus influenza y la gripe aviar. *Acta Médica Costarricense*. Acta Méd Costarricense 50(1): 13-19
127. **Hidalgo H. 2005.** Aclaraciones sobre la hipotética relación de la Influenza de las aves y la Influenza humana. *Novedades Médico Científicas*. AMEVEA. Chile Marzo 14. 2005.
128. **Hinshaw VS, Webster RG, Turner B. 1980.** The perpetuation of Orthomyxoviruses and Paramyxoviruses in Canadian waterfowl. *Canadian J Microb* 26: 622-629.
129. **Hoong ChT, Ellisk TM, Wong ChW, Guan Y, Xiang ShG, Peng G, Lamichhane Ch, Maladis C, Tan S, Selleck P, Parkinson J. 2007.** Performance Evaluation of

- Five Detection Tests for Avian Influenza Antigen with Various Avian Samples. *Avian Dis* 51(1):96-105.
130. **Horimoto T, Kawaoka Y. 2001.** Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin. Microbiol Rev.* 14:129-149.
 131. **Hubalek Z. 2004.** An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *J Wild Dis* 40: 639-659.
 132. **Hulse DJ, Webster RG, Russell RJ, Perez DR. 2004.** Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *J Virol.* 78(18): 9954-64.
 133. **Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, Seiler P, Govorkova EA, Krauss S, Scholtissek C, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Long HT, Naipospos TSP, Chen H, Ellis TM, Guan Y, Peiris JSM, Webster RG. 2005.** Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proceed of the National Acad of Sciences* 102 (30): 10682-10687.
 134. **INFOSAN. 2005.** Highly pathogenic H5N1 avian influenza outbreaks in poultry and in humans: Food safety implications. Information note N° 7/2005 - Avian Influenza. [Internet], [15/12/2007]. Disponible en:
http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_07_AI_Nov05_en.pdf
 135. **International Program Committee for the Sixth International Symposium on Avian Influenza. 2007.** Recommendations of the Sixth International Symposium on Avian Influenza. *Avian Dis* 51:160.
 136. **Instituto de Recursos Naturales (INRENA).** Humedales de Puerto Viejo. Resumen Ejecutivo. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
<http://media.peru.info/temario/attach/hpv.pdf>
 137. **Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI).** Datos de población de aves hasta 1998. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
<http://www.inei.gob.pe/biblioineipub/bancopub/Est/Lib0351/7311/c7311010.HTM>
 138. **Ito T, Okazaki K, Kawaoka Y, Takada A, Webster RG, Kida H. 1995.** Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Arch Virol.* 140(7): 1163-1172.
 139. **Jackson DC, Drummer HE, Urge L, Otvos LJR, Brown LE. 1994.** Glycosylation of a synthetic peptide representing a T-cell determinant of influenza virus haemagglutinin results in loss of recognition by CD4+T-cell clones *Virol.* 199: 422-430.
 140. **Jones YL, Swayne DE. 2004.** Comparative pathobiology of low and high pathogenicity H7N3 Chilean avian influenza viruses in chickens. *Avian Dis.* 48: 119-128.

141. **Kaleta EF, Hergarten G, Yilmaz A. 2005.** Avian influenza A viruses in birds - an ecological, ornithological and virological view. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 112(12): 448-456.
142. **Kalthoff D, Breithaup A, Teifke JP, Globig A, Harder T, Mettenleiter TC, Beer M. 2008.** Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) in experimentally infected adult mute swans. *Emerg Infect Dis* 14:1267-1270.
143. **Kang SJ, Kim HM; Kim YH, Hwang SD, Shin JS, Ku KB, Kim HS, Sea SH. 2009.** Phylogenetic analysis of reassorted avian influenza viruses isolated from Korean domestic ducks from 2005 to 2007. *Virus Genes.* 38(1): 80-84.
144. **Karesh WB, Cook RA, Gilbert M, Newcomb J. 2007.** Implication of wildlife trade on the movement of avian influenza and other infectious diseases. *J Wildl Dis* 43: S55-S59.
145. **Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NL, Varich AS, Lipatov YA, Smirnov EA, Govorkova AS, Gitelman DK, Lvov, Webster RG. 2002.** Structure of antigenic sites on the haemagglutinin molecule of H5 influenza virus and phenotypic variation of escape mutants. *J Gen Virol* 83: 2497-2505.
146. **Kaverin NV, Rudneva IA, Ilyushina NL, Lipatov YA, Krauss S, Webster RG. 2004.** Structural Differences among Hemagglutinins of Influenza A Virus Subtypes are Reflected in Their Antigenic Architecture: Analysis of H9 Escape Mutants. *J Virol* 78: 1240-249.
147. **Kawoaka Y, Chambers TM, Sladen WL, Webster RG. 1988.** Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild duck? *Virol* 163: 247-250.
148. **Keawcharoen J, Van Riel D, Van Amerongen G., Bestebroer T, Beyer WE, Van Lavieren R, Osterhaus AD, Fouchier RAM, Kuiken T. 2008.** Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 14(4): 600-607
149. **Kelly TR, Hwkins MG, Sandrock CE. Boyce WM. 2008.** A Review of Highly Pathogenic Avian Influenza in Birds with an emphasis on Asian H5N1 and Recommendations for prevention and control. *Rev Art J Avian Med and Surgery* 22(1): 1-16.
150. **Kida H, Okasaki K, Takada A, Ozaki H, Tashiro M, Lvov DK, Shortridge KF, Webster RG. 2001.** Global surveillance of animal influenza for the control of future pandemics. *International congress series* 1219(2001): 169-171.
151. **Kim JK, Negovetich N J, Heather LF, Webster RG. 2009.** Ducks: The "Trojan Horses" of H5N1 influenza. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 3(4): 121 -128.
152. **Kishida N, Skoda Y, Isoda N, Matsuda K, Eto M, Sunago Y, Umemura T, Kida H. 2005.** Patogenicity of H5 Influenza viruses for ducks. *Arch. Virol* 150 (7):1383-1392.

153. **Krauss S, Walker D, Pryor P, Niles L, Chenghong L, Hinshaw V, Webster RG. 2004.** Influenza A viruses of Migrating Wild Aquatic Birds in North America. 2004. *Vect Borne and Zoon Dis.* 4(3): 177-189.
154. **Krauss S, Obert CA, Franks J, Walker D, Jones K, Seiller P, Niles L, Pryor SP, Obenauer JC, Naeve CW, Widjaja L, Webby RJ, Webster RG. 2007.** Influenza in Migratory Birds and Evidence of Limited Intercontinental Virus Exchange. *PLoS Pathog.* 3: 167.
155. **Kuiken T, Holmes EC, McCauley J, Rimmelzwaan GF, Williams CS, Grenfell BT. 2006.** Host species barriers to Influenza Virus Infections. *Science* 312: 4-13.
156. **Lamb RA, Krug RM. 2001.** Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: *Virology.* Knipe DM, Howley PM. (Eds.), 4th ed. Philadelphia, PA, USA: R. Lippincott-Raven. p 1487-1531.
157. **Lang AS, Kelly A, Runstadler JA. 2008.** Prevalence and diversity of avian influenza viruses in environmental reservoirs. *J Gen Virol* 89: 509-519
158. **Lebarbenchon C, Van Der Werf S, Thomas F, Aubin JT, Azebi S, Cuvelier F, Jeannin P, Roca V, Chang ChM, Raiser Y, Roche B, Guegán JF, Renaud F, Gauthier C. 2007.** Absence of detection of highly pathogenic H5N1 in migratory waterfowl in Southern France in 2005- 2006. *Infect Genet Evol* 7: 604-608.
159. **Linzito OR, Espinoza C, Rodriguez CA, Pecoraro M. 2005.** Reseña sobre vigilancia y prevención de la influenza aviar y rol zoonótico. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* La Plata sept/dic. 2005. 39(4): 485-492
160. **Liu J, Xiao H, Lai F, Zhu O, Qiu K, Zhang XW, Zhang D, Zhao, Wang G, Feng Y, Ma J, Liu W, Wang J, Gao GF. 2005.** Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science.* 309(5738): 1206.
161. **Londt BZ, Banks J, Alexander DJ. 2007.** Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in vivo tests. *Avian Pathol* 36: 347–350.
162. **Lowen AC, Mubareka S, Steel J, Palese P. 2007.** Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLoS Pathog* 3(10): e151. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://www.plospathogens.org/article/info:doi/10.1371/journal.ppat.0030151>
163. **Ludwig S, Stitz L, Planz O, Van H, Fitch WM, Scholtissek C. 1995.** European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? *Virology* 212: 555-561.
164. **Makarova NV, Kaverin NV, Krauss S, Senne D, Webster RG. 1999.** Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America. *J Gen Virol* 80 (12): 3167- 3171.
165. **Malo A. 2006.** El control de la Influenza aviar por medio de la vacunación. *Venezuela Avícola* 51:26. [Internet], [26/06/2007]. Disponible en: http://www.engormix.com/el_control_influenza_aviar_s_articulos_1490_AVG.htm

166. **Marco MA, Foni E, Campitelli L, Delogu M, Raffini E, Chiapponi Ch, Barigazzi G, Cordioli P, Trani LD, Donatelli I. 2005.** Influenza virus circulation in wild aquatic birds in Italy during H5N2 and H7N1 poultry epidemic periods (1998 to 2000). *Avian Pathol* 34(6): 480-485.
167. **Marquez M. A. 2007.** Evolución de la influenza aviar ¿Una enfermedad exótica o enzoótica?. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
http://www.geosalud.com/enfermedades_infecciosas/gripeaviar.htm
168. **Martins P. 2003.** Impacto Económico de las Enfermedades Avícolas de la lista “A” de la OIE. En: II Seminario Internacional OIE ALA sobre Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle. 13-15 Agosto. 2003. Lima Perú.
169. **Martin V, Forman A, Lubroth J. 2007.** Preparándose para la Influenza aviar altamente patógena. Dir. de Producción y Sanidad Animal. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Roma Italia. 2007.
170. **Martin V, Sims L, Lubroth J, Pfeiffer D, Slingenbergh J, Domenech J. 2006.** Epidemiology and ecology of highly pathogenic avian influenza with particular emphasis on South East Asia. *Dev Biol (Bassel)* 124: 23-36.
171. **Matrosovich MM, Zhou N, Kawaoka Y, Webster RG. 1999.** The surface glycoprotein of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol* 73: 1146-55.
172. **Morgan IR, Kelly AP. 1990.** Epidemiology of an avian influenza outbreak in Victoria in 1985. *Aust. Vet. J.* 67:125-128
173. **Ministerio de Salud. MINSA. Perú. 2005.** Plan Nacional de Preparación y respuesta frente a una potencial pandemia de Influenza. Lima-Perú. 49 p.
174. **Ministerio de Salud. MINSA. Perú. 2006.** Información acerca del virus de la Gripe Aviar. [Internet], [21/05/2006]. Disponible en:
<http://www.minsa.gob.pe/portal/Especiales/2006/aviar/default.asp>
175. **Monasi LF, Icochea E. 1999.** Seroprevalencia del virus de la Influenza Aviar en broilers en la provincia de Huaral. Lima. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor San Marcos. 43 p.
176. **Monke J, Corn ML. 2007.** Avian Influenza in Poultry and Wild Birds. CRS Report for congress. Congressional Research Service. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://www.nationalaglawcenter.org/assets/crs/RL33795.pdf>
177. **Moutou, F. 2007.** La vengeance de la civette masquée, capítulos “La vengeance de la civette”; y “Bibovirus: des virus ailés” Le Pommier, Paris. p 15- 42 / p 43-68.
178. **Mulatti P, Kitron U, Mannelli A, Ferré N, Marangon S. 2006.** Spatial analysis of the 1999-2000 Highly Pathogenic Avian Influenza (H7N1) Epidemic in Northern Italy. *Avian Dis* 51(51): 421-424.

179. **Municipalidad de San Antonio de Cañete. 2005.** Las aves y los humedales de Puerto Viejo. 2005. Archivos demográficos de aves silvestres. Cañete Perú. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
<http://www.munisanantonio.gob.pe/download.php?id=3-1>.
180. **Munster VJ, Wallensten A, Baas C, Rimmelzwaan GF, Schutten M, Olsen B, et al. 2005.** Mallards and highly pathogenic avian influenza ancestral viruses, northern Europe. *Emerg Infect Dis* 11: 1545–51.
181. **Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenström J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WEP, Schutten M, Olsen B, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. 2007.** Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *J Wildf Dis* 43(Sup. 3): 15-20.
182. **Muñoz K, Salazar M, Icochea E, Gutiérrez F, Alba M, Gonzáles R, Hermosa C, Elias R. 2000.** Identificación de Agentes Patógenos en Aves Silvestres de la zona Reservada de Pantanos de Villa. Datos no publicados. Facultad Med. Vet. - Univ. Nac. Mayor San Marcos. Lima-Perú.
183. **Muñoz MJ, Sánchez-Vizcaíno JM, Peris S. 2006.** Can highly pathogenic avian influenza (HPAI) reach the Iberian Peninsula from Asia by means of migratory birds? Short communication. *Spanish Journ Agricultural Res* 4(2): 140-145.
184. **Muzaffar SB Ydenberg RC, Jones IL. 2006.** Avian Influenza: An Ecological and Evolutionary Perspective for Waterbird Scientists. *Waterbirds* 29(3): 243-257.
185. **National Agricultural Biosecurity Center (NABC), Kansas State University. 2009.** Avian Influenza Fact Sheet. Wednesday, September 30th 2009. [Internet], [21/12/2007]. Disponible en:
<http://nabc.ksu.edu/content/factsheets/category/Avian%20Influenza>
186. **National Wildlife Health Center - United States Department of the Interior/ United States Geological Survey. (NWHC- USDI/ USGS), 2009.** Surveillance Plan for the Early Detection of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus in Migratory Birds in the United States: Surveillance Year 2009. [Internet], [21/02/2010]. Disponible en: <http://www.nwhc.usgs.gov/>
<http://www.nwhc.usgs.gov/publications/other/aisurveillanceplan.jsp>
187. **Nin Pratt A, Falconi C., 2006.** Impacto económico potencial de la influenza aviar en el sector avícola de América Latina y el Caribe. Banco Interamericano de Desarrollo. Washington, D.C. Serie de informes técnicos del Departamento de Desarrollo Sostenible. [Internet], [16/04/2006]. Disponible en:
<http://www.iadb.org/sds/doc/RUR-Impactoeconómicopotencialdelagripeaviar.pdf>
188. **Noda J. 2006.** Virus de la Influenza Aviar: Características Genéticas Antigénicas y Diagnóstico Actual. *Rev Salud Anim. Cuba.* 28(3): 147-57.
189. **Normile D. 2006.** Avian influenza. Evidence points to migratory birds in H5N1 spread. *Science* 311: 1225.

190. **[OIE] Oficina Internacional de Epizootias. 2003.** Avian Influenza. Prevención es la mejor política contra la IA.
191. **[OIE] Oficina Internacional de Epizootias. 2005.** Conferencia Científica Internacional sobre Influenza Aviar. Recomendaciones. OIE. Paris Francia. 7-8 Abril 2005. [Internet], [12/01/2006]. Disponible en:
http://www.oie.int/downld/Good_Governance/E_3.1.4.8.pdf
192. **[OIE] Oficina Internacional de Epizootias. 2008.** Código Sanitario para los animales terrestres. Influenza Aviar. [Internet], [28/04/2008]. Disponible en:
http://www.oie.int/esp/normes/MCode/es_chapitre_1.10.4.htm
193. **[OIE] Oficina Internacional de Epizootias. 2009.** Terrestrial Manual. Avian Influenza. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. [Internet], [15/08/2009]. Disponible en:
http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf
194. **[OIE/FAO/IZSVe/UE] Oficina Internacional de Epizootias/ Food Alimentary Organization/ Institute Zooprofilactic of Venecia/ Europe Union. 2007.** Conferencia Científica Co-organizada en Verona Italia. La vacunación: una herramienta de lucha contra la Influenza Aviar. 20-22 marzo 2007. Documento de información de la OIE. Recomendaciones de Verona. [Internet], [10/08/2010]. Disponible en:
http://www.oie.int/esp/info_ev/Other%20Files/E_Guidelines%20on%20AI%20vaccination.pdf
195. **Okazaki K, Takada A, Ito T, Imai M, Takakuwa H, Hatta M, Ozaki H, Tanizaki T, Nagano T, Ninomiya A, Demenev VA, Tyaptirganov MM, Karatayeva TD, Yamnikova SS, Lvov DK, Kida H. 2000.** Precursor genes of future pandemic influenza viruses are perpetuated in ducks nesting in Siberia. Arch Virology 145: 885-893.
196. **Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. 2006.** Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. Review. Science. 21(312) 5772: 384-388.
197. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2005.** La Gripe Aviar (“Gripe del pollo”) y la importancia de su transmisión al ser humano. Revista Trimestral Latinoamericana y de Desarrollo Sustentable. Serie de informes sobre la Gripe Aviar. [Internet], [15/11/2006]. Disponible en:
http://www.revistafuturos.info/futuros_11/gripe_aviar.htm
198. **[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2007.** Casos confirmados en humanos de Influenza Aviar por H5N1, 25 Noviembre 2003 - 24 Noviembre 2006. Reporte Epidemiológico semanal OMS 82: 41-48.

199. **[OPS] Organización Panamericana de la Salud. 2006.** El control de las enfermedades transmisibles, 18ª edición. Publicación Científica y Técnica de la OPS N°613, p 379-386.
200. **Organismo Internacional de Sanidad Agrícola. 2010.** Influenza Aviar. México, Belice, Guatemala, el Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, República Dominicana. Copyright 2010. Sistema Integrado de Información. [Internet], [3/07/2010]. Disponible en: http://www.oirsa.org/portal/Influenza_Aviar.aspx
201. **[PIF & WO] Pacific Islands Fish and Wildlife Office. 2006.** U.S. Fish and Wildlife Service and National Wildlife Health. Center Honolulu Field Station. U.S. Geological Survey. Final Draft. A Surveillance Plan for Asian H5N1. Avian Influenza in Wild Migratory Birds in Hawaii and the U.S.-Affiliated Pacific Islands. May 1, 2006
202. **Pantin - Jackwood MJ, Suarez DL, Spacjman E, Swayne DE. 2007.** Age at infection affects the pathogenicity of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in duck. *Virus Res* 130(1-2): 151-161
203. **Palese P, García - Sartre A. 1999.** Influenza Viruses (Orthomyxoviruses): Molecular Biology. In: Granoff A, Webster RG, eds. *Encyclopedia of Virology*: Vol. 2, 2ª ed. USA. San Diego: Academic Press. p 830-836.
204. **Palese P, García - Sastre A. 2002.** Influenza vaccines: present and future. *J Clin Invest* 110: 9-13.
205. **Perdue ML, García M, Senne D, Fraire M. 1997.** Virulence - associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of Avian Influenza viruses. *Virus Res* 49: 173-86.
206. **Perdue ML, Suarez DL. 2000.** Structural features of the avian influenza virus Hemagglutinin that influences virulence. *Vet. Microbiology* 74(Issues 1-2): 77-86.
207. **Pereda AJ, Uhart M, Perez AA, Zaccagnini ME, La Sala L, Decarre J, Goijman A, Solari L, Suarez R, Craig MI, Vagnozzi A, Rimondi A, König G, Terrera MV, Kaloghlian A, Song H, Sorrell EM, Perez DR. 2008.** Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America. *Virology* - en prensa. [Internet], [12/01/2009]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632129>
208. **Pérez-Breña P, Casas I. 2004.** Infecciones producidas por los virus de la gripe aviar A (H5N1) en las poblaciones de aves del sudeste asiático y en la especie humana. *Enf Infecc Microbiol Clin*. 22(7): 412-8.
209. **Perez DR, Lim W, Seiler JP. et al. 2003.** Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular changes on HA that correspond to adaptation from ducks to chicken. *J Virol* 77(5): 3148-3156.
210. **Perkins LE, Swayne DE, 2002.** Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis*. 46(1): 53-63.

211. **Petterson AT, Benz BW, Papes M. 2007.** Highly pathogenic H5N1 avian influenza: entry pathways into North America via bird migration. PLoS ONE. 2: e261. [Internet], [01/11/2007]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1803015/>
212. **Peyre M, Fusheng G, Desvaux S, Roger F. 2009.** Review Article. Avian influenza vaccines: a practical review in relation to their application in the field with a focus on the Asian experience. Epidemiol Infect. 137: 1-21.
213. **[PIC y OCHA] Coordinación para la Pandemia de Influenza y Oficina de Coordinación para Asuntos Humanitarios. 2010.** Ecoepidemiología de la Influenza Aviar. X Curso de Influenza. Centro Regional de Capacitaciones en Salud. 18 de Marzo del 2010. Ciudad de Panamá. Panamá. 34p.
214. **Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. 1992.** Influenza virus M2 protein has ion channel activity. Cell 69: 517-528.
215. **Rivera GO. 2006.** Máxima alerta para América. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. ISSN 1695-7504. 7(10). Oct. 2006. [Internet], [25/12/2006]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101006.html>
216. **Rodriguez EF. 2006.** La gripe o Influenza Aviar. Instituto de estudios del huevo. [Internet], [08/12/2006]. Disponible en: http://www.institutohuevo.com/images/archivos/gripe_aviar._ferri06_13125226.pdf
217. **Rodríguez V, Rubio A, Sánchez VRJ. 2009.** El papel de la fauna silvestre en las enfermedades emergentes. RCCV VOL 3(2): 244-252. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/Zoonosis/03-emergentes.pdf
218. **Rojas OH, Moreira ZR. 2002.** Influenza Aviar en Chile. 2002: Una Sinopsis. Ministerio de Agricultura. División de Protección Pecuaria. Salud Animal e Inocuidad de los Alimentos. Gobierno de Chile. [Internet], [30/11/2006]. Disponible en: http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_6_numero_especial_oct_2006/articulos/sinopsis_IA_2002.pdf
219. **Rohm C, Horimoto T, Kawaoka Y, Suss J, Webster RG. 1995.** Do haemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? Virology 209: 664-670.
220. **Rott R, Klenk HD, Nagai Y, Tashiro M. 1995.** Influenza viruses, cell enzymes and pathogenicity. Am. J. Respir. Crit. Care Med 152: S16-S19
221. **Rose K, Newman S, Uhart M, Lubroth J. 2007.** Vigilancia de la Influenza Aviar altamente patógena en las aves silvestres. Toma de muestras de aves sanas, enfermas y muertas. Food Alimentary Organization. FAO. División de Producción y Sanidad Animal. [Internet], [02/02/2007]. Disponible en:

- <ftp://ftp.fao.org/docrep/FAO/010/a0960s/a0960s00.pdf>
222. **Sakagushi T, Leser G, Lamb R. 2006.** The Ion channel activity of the Influenza Virus M2 Protein Affects Transport through the Golgi apparatus. *The Journal of Cell Biology* 133(4): 733-747.
223. **Sanz PB, 2009.** Influenza de las aves y gripe humana de origen aviar. Visión general. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/584/601>
224. **Sánchez A, Agüero M, Jiménez MA, Gómez-Tejedor C. 2007.** Influenza aviar: Diagnóstico de laboratorio. Laboratorio Central de Veterinaria. Laboratorio Nacional de Referencia para Influenza Aviar. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
<http://www.analesranf.com/ranf/index.php/mono/article/view/586/603>
225. **Schultz - Chery S, Cocí M, Thompson E, Tumpey TM. 2003.** Examining the Cellular Pathways Involved in Influenza virus induced Apoptosis. *Avian Dis.* 47: 968-971.
226. **Senne DA. 1998.** Virus propagation in embryonating eggs. In: Swayne De, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, eds. *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 4th ed. American Association of Avian Pathologists. USA. PA: Kennet Square. 235-247.
227. **Senne DA. 2006.** Avian Influenza in North and South America, 2002–2005. *Avian Dis* 51 (s1): 167-173.
228. **Seene DA, Suárez DC, et al. 2006.** “Ecology and epidemiology of avian influenza in North and South America”. *Dev Biol (Bassel)* 124: 37-44.
229. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2005.** Documento Sustentatorio para la declaración del Perú como país libre de Influenza Aviar. Programa Nacional de Sanidad Avícola. Dirección General de Sanidad Animal. SENASA. Lima - Perú.
230. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2005.** Procedimientos para enfrentar un brote de Influenza aviar. Consejos prácticos. *Mundo Avícola y Porcino*. Perú N° 59. Set - Oct. 2005.
231. **[SENASA - MINSA - MINAG] Servicio Nacional de Sanidad Agraria - Ministerio de Salud - Ministerio de Agricultura. 2008.** Reportes periodísticos del diario El Peruano. Febrero 2008.
232. **Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawaoka Y. 2006.** Avian flu: Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440: 435- 436.
233. **Shortridge KF, Melville DS. 2006.** Domestic poultry and migratory birds in the interspecies transmission of avian influenza viruses: a view from Hong Kong. *Waterbirds around the world*. [Internet], [15/11/2006]. Disponible en:
http://www.jncc.gov.uk/PDF/pub07_waterbirds_part4.2.4.pdf
234. **Sims LD. 2007.** Lessons learned from Asian H5N1 outbreak control. *Avian Dis.* 51: 174-181.

235. **Sinnecker H, Sinnecker R, Zilske E, Koehler D. 1982.** Detection of Influenza A viruses and influenza epidemics in wild pelagic birds by sentinels and population studies. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg* 253(3): 297-304.
236. **Slemons RD, Johnson DC, Osborn JS, Hayes F. 1974.** Type A Influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian Dis* 18: 119-24.
237. **Slemons RD, Swayne DE. 1990.** Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis* 34: 277–284.
238. **Slemons RD, Hansen WR, Converse KA, Senne DA. 2003.** Type A Influenza Virus Surveillance in Free Flying, Nonmigratory Ducks Residing on the Eastern Shore of Maryland. *Avian Dis.* 47: 1107-1117.
239. **Smith GJ, Naipospos TS, Nguyen TD, De Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YH, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LL, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JS, Guan Y. 2006.** Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam. *Virology* 350: 258-268.
240. **Soares PB, Demetrio C, Sanfilippo L, Kawanoto AH, Brentano L, Durigon EL. 2006.** Standardization of a Duplex RT-PCR for the Detection of Influenza A and Newcastle Disease Viruses in Migratory Birds. *J. Virol. Methods.* 123(2): 25-30.
241. **Songserm, TR., Jam-on R, Sae-Heng N, Meemak N, Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Webster RG. 2006.** Domestic ducks and H5N1 Influenza Epidemic, Thailand. *Emerging Infect. Dis.* 12(4): 575-581.
242. **Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, Lohman K, Daum LT, Suarez DL. 2002.** Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 haemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3256–3260.
243. **Spackman E, Suarez DL. 2005.** Evaluation Studies Use of a novel virus inactivation method for a multicenter avian influenza real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction proficiency study. *J Vet Diagnost Invest* 17 (1): 76-80.
244. **Spackman E, Stallknecht DE, Slemons RD, Winker K, Suarez DL, Scott M, Swayne DE. 2005.** Phylogenetic analyses of type A influenza genes in natural reservoir species in North America reveals genetic variation. *Virus Res.* 114: 89-100.
245. **Spackman E, Mc. Cracken KG, et al. 2006.** “H7N3 avian influenza virus found in a South American wild duck is related to the Chilean 2002 poultry outbreak, contains genes from equine and North American wild bird lineages, and is adapted to domestic turkeys”. *J. Virol.* 80(15): 7760-4.
246. **Spackman E, McCracken KG, Winker K, Swayne DE. 2007.** An Avian Influenza Virus from Waterfowl in South America Contains Genes from North American Avian and Equine Lineages. *Avian Dis* 51(s1): 273-274.

247. **Spackman E, Hon SI, Suarez DL, Slemons RD, Stallknecht DE. 2008.** Analytical validation of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction test for Pan-American lineage H7 subtype Avian influenza viruses. *Journal Vet. Diagnost. Investig.* 20(5): 612-616.
248. **Spackman E, Suarez DL, Senne DA. 2008.** Avian Influenza. *Diagnostics and Surveillance Methods.* [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/16378/1/IND44069367.pdf>
249. **Spackman E. 2009.** The ecology of avian influenza virus in wild birds: What does this mean for poultry? *Poult Sci* 88: 847-850.
250. **Stallknecht DE, Shane SM. 1988.** Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Communications* 12: 125-141.
251. **Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT, Zwank PJ. 1990.** Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis* 34: 406-11.
252. **Stallknecht DE, Kearney MT, Shane SM, Zwank PJ. 1990.** Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Dis* 34: 412-418.
253. **Stallknecht DE, Shane SM, Zwank PJ, Senne DA, Kearney MT. 1990** Avian Influenza Viruses from Migratory and Resident Ducks of Coastal Louisiana. *Avian Dis* 34(2): 398-405
254. **Stallknecht DE. 1998.** Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza.* 1998. PA: USA. p 61-69.
255. **Stallknecht DE. 2003.** Ecology and Epidemiology of Avian Influenza Viruses in Wild Bird Populations: Waterfowl, Shorebirds, Pelicans, Cormorants, etc. *Avian Dis* 47: 61-69.
256. **Stallknecht DE, Brown JD. 2007.** Wild Birds and the Epidemiology of Avian Influenza. *J Wild Dis* 43 (3) p: 515-520.
257. **Stieneke - Grober A, Vey M, Angliker H, Shaw E, Thomas G, Roberts C, et al., 1996.** Influenza virus haemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin endoprotease. *EMBO J* 1992:112047-14.
258. **Sturm-Ramirez KM, Hulse-Post DJ, Govorkova EA, Humberd J, Seiler P, Puthavathana P, Buranathai C, Nguyen TD, Chaisingh A, Long HT, Naipospos TSP, Chen H, Ellis TM, Guan Y, Peiris JSM, Webster RG. 2005.** Are Ducks Contributing to the Endemicity of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Asia? *J Virol* 79(17): 11269-11279.
259. **Suarez D. 1998.** Molecular diagnostic techniques can we identify influenza viruses differentiate subtypes and determine pathogenicity potential of viruses by RT-PCR? *Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza 1997.* Athens

- Georgia. US. Animal Health Association Kennett Sq. PA, USA Avian Dis 47(Especial Issue): 318-325.
260. **Suarez DL. 2000.** Evolution of avian influenza viruses. *Vet Microbiol* 74(1-2):15-27.
 261. **Suarez DL, Schultz-Cherry S. 2000.** Immunology of avian influenza virus: a review. *Developm and Comp Immunol* 24: 269-83.
 262. **Suarez D. 2004.** Avian Influenza: An Emerging Pathogen. Emergent and Re emerging Disease. USDA/ARS. Southeast Poultry Research Laboratory. USA.
 263. **Suarez DL. 2005.** Overview of avian influenza DIVA test strategies. USDA/ARS, Southeast Poultry Research Laboratory, 934 College Station Road, Athens, GA 30605. USA.
 264. **Suarez DL, Das A, Ellis E. 2007.** Revisión de pruebas moleculares rápidas de diagnóstico para el virus de influenza aviar. *Avian Dis* 51(s1): 201-208.
 265. **Suzuki Y, Masatoshi N. 2002.** Origin and Evolution of Influenza Virus Hemagglutinin Genes. *Mol Biology and Evolution* 19: 501-509.
 266. **Süss J, Schäfer J, Sinnecker H, Webster RG. 1994.** Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. *Arch Virol* 135 (1-2): 101-14.
 267. **Swayne DE, Halvorson DA. 2003.** Influenza. In: Calnek BW. *Diseases of Poultry*. Chapter 5. 11th ed. Iowa State Press, USA. Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists. p 135- 160.
 268. **Swayne DE, Senne DA, Beard CW. 1998.** Avian Influenza. In: Swayne DE, Glisson JR, Kwood MW, Pearson JE, Reed WM. *Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 4th ed. American Association of Avian Pathologist. Kennet Square, PA, USA p 150-155.
 269. **Swayne DE, Suarez DL. 2000.** Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech. Off Int Epiz* 19: 463-482.
 270. **Tala GCh. 2006.** Que hacen aquí esas gaviotas... qué hacen aquí, tan lejos de su lugar natal. Ministerio de Agricultura. División de Protección Pecuaria. Salud Animal e Inocuidad de los Alimentos. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile. SAG. *Bol. Vet. Oficial*. 5. 2006 (1). 24 p.
 271. **Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM., Wang R, Jin G, Fanning TG. 2005.** Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 437(7060): 889-893.
 272. **[CFSPH/ IICAB / OIE] The Center Food Security & Public Health / Institute for International Cooperation in Animal Biologics / Oficina Internacional de Epizootias. 2009.** Influenza Aviar de Alta Patogenicidad. Peste de las Aves de Corral, Gripe Aviar. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/influenza_aviar_de_alta_patogenicidad.pdf

273. **Tollis M, Triani DJ. 2002.** Recent Developments in Avian Influenza Research: Epidemiology and Immunoprophylaxis. *The Vet Journ* 164:202-215.
274. **Tumpey TM, Suárez DL, Perkins LE, Senne DA, Lee J, Mo IP, Sung TM, Swayne DE. 2003.** Evaluation of a High Pathogenicity H5N1 Avian Influenza Infection. *Avian Dis* 51: 408-413.
275. **Turner AJ. 2004.** The role of wild aquatic birds in the epidemiology of avian influenza in Australia. *Australian Vet. J* 82(11): 713.
276. **[UE] Unión Europea. Síntesis de la legislación Europea en sanidad animal. 2008.** Medidas contra la Influenza Aviar. [Internet], [03/07/2009]. Disponible en: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/animal_health/112025_es.htm
277. **[USDA] United States Department of Agriculture. 2006.** Interagency Strategic Plan. An Early Detection system for highly pathogenic H5N1. Avian Influenza in wild migratory birds. [Internet], [03/04/2006]. Disponible en: http://www.usda.gov/documents/wildbirdstrategicplanpdf_seg6.pdf
278. **[USDA - DOI, HH5] United States Department of Agriculture. Department of the interior. 2006a.** Ampliación del despistaje de la Influenza Aviar tipo H5N1 Altamente patógeno en aves migratorias. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: http://www.usda.gov/wps/portal/en_espanol?contentidonly=true&contentid=en_espanol/sp0095.06.html
279. **[USDA - DOI, HH5] United States Department of Agriculture. Department of the interior. 2006b.** DOI, USDA, State Partners Test More Than 13,000 Wild Migratory Birds in Alaska. No Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Detected. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: http://www.doi.gov/archive/news/06_News_Releases/060829a.html
280. **[USDA] United States Department of Agriculture. 2007.** Plan Estratégico entre agencias de EEUU. Un sistema de detección temprana del virus H5N1 de la Influenza aviar altamente patógena en aves migratorias silvestres. [Internet], [15/01/2007]. Disponible en: http://www.usda.gov/wps/portal/en_espanol?contentidonly=true&contentid=en_espanol/sp0095.06.html
281. **Van Borm S, Steensels M, Ferreira HL, Boschmans M, De Vriese J, Lambretch B, Van Den Berg T. 2007.** A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction control and its application to avian influenza diagnosis and quantification. *Avian dis* 51(1): 213-220.
282. **Van de Kam J, Ens B, Piersma T, Zwarts L. 2004.** Shorebirds: An Illustrated Behavioural Ecology (KNNV Publishers, Utrecht, Netherlands, 2004). 368p.
283. **Van der Schalie WH, Jr. Hank SG, Bantle JA, De Rosa CT, Finch RA, Reif JS, Reuter RH, Backer LC, Burger J, Folmar LC, Stokes WS. 1999.** Animals as

- Sentinels of Human Health Hazards of Environmental Chemicals. Environmental Health Perspectives. 107(4).
284. **Van Gils JA, Munster VJ, Radersma R, Liefhebber D, Fouchier RA, Klaassen M. 2007.** Hampered foraging and migratory performance in swans infected with low-pathogenic avian influenza A virus. PLoS ONE. 2: e184. [Internet], [03/04/2008]. Disponible en:
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0000184>
 285. **Van Riel D, Munster VJ, De Wit E, Rimmelzwaan GF, Fouchier RA, Osterhaus V, Kuiken T. 2006.** H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. Science 312: 399.
 286. **Vargas M. 2003.** Sistema Sanitario de Costa Rica: Resultado de la prevención en el largo plazo. En: II Seminario Internacional OIE - ALA sobre Influenza Aviar y la Enfermedad de Newcastle. Lima Perú. 13-15 Agosto.
 287. **Vascellari M, Gramoto L, Trevisan L, Basilicata L, Toffan A, Milani A, Mutinelli F. 2007.** Pathologic Findings of highly pathogenic Avian Influenza virus. A/Duck/Vietnam/12/05 (H5N1) in experimentally infected Pekin Duck Based on Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. Vet Pathol. 44:635-642.
 288. **Villegas P. 1998.** Manual de procedimientos de diagnóstico de laboratorio para enfermedades aviares.
 289. **Voyles BA. 2002.** Orthomyxoviruses. In: The Biology of Viruses. 2^a ed. NY: McGraw-Hill pp.147.
 290. **Wallensten A, Munster VJ, Elmberg J, Osterhaus AD, Fouchier RA, Olsen B. 2005.** Multiple gene segment reassortment between Eurasian and American lineages of influenza A virus (H6N2) in Guillemot (Uria aalge). Arch. Virol 150: 1685-1692.
 291. **Ward MP, Maftei D, Apostu C, Suru A. 2008.** Geostatistical visualisation and spatial statistics for evaluation of the dispersion of epidemic highly pathogenic avian influenza subtype H5N. Vet Res 39: 22.
 292. **Ward MP, Maftei DN, Apostu CL, Suru AR. 2009.** Association between outbreaks of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 and migratory waterfowl (family Anatidae) populations. Zoonoses Public Health 56(1):1-9.
 293. **Weaver T. 2005.** Surveys in Waterfowl Part I: The Role of Wild and Domestic Waterfowl in Avian Influenza Outbreaks in Domestic Poultry. Avian Influenza. National Surveillance Unit. NAHSS Outlook. February 2005. Animal Health Monitoring & Surveillance. Animal and Plant Health Inspection Service. USDA. [Internet], [25/04/2006]. Disponible en:
<http://www.aphis.usda.gov/vs/ceah/ncas/nsu/outlook>
 294. **Webster RG. 1978.** Intestinal influenza: replication and characterization of Influenza Viruses in ducks. Virol 84: 268-278.

295. **Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992.** Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microb Rev* 56: 152–179.
296. **Webster RG, Hulse DJ. 2004.** Microbial adaptation and change: Avian Influenza. *Rev. Sci. Tech.* 23(2): 453-65.
297. **Webster RG, Hulse DJ. 2005.** Controlling avian flu at the source. Department of Infectious Diseases, St Jude Children's Research Hospital, Division of Virology, Memphis, Tennessee 38105, USA. *Nature* 435: 415-416.
298. **Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. 2006.** H5N1 Outbreaks and Enzootic Influenza. *Emerg Infect Dis* 12: 3-8.
299. **Webster R, Krauss S, Hulse-Post D, Stum - Ramirez K. 2007a.** Evolución del virus de la Influenza en Aves Silvestres. Division of Virology Department of Infectious Diseases, St. Jude Children/ Research Hospital, 332 North Lauderdale Memphis, Tennessee 38105, USA. [Internet], [05/06/2007]. Disponible en: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2007_01_15/en/index.html
300. **Webster RG, Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Guan Y, Peiris M, Smith G, Chen H. 2007b.** Changing Epidemiology and Ecology of Highly Pathogenic Avian H5N1 Influenza Viruses. *Avian Dis* 51(s1): 269-272.
301. **Wetlands International Globalsite. 2007.** Latinoamerica y el Caribe. Influenza aviar y aves migratorias. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <http://lac.wetlands.org/WHATWEDO/Influenzaaviar/tabid/1152/Default.aspx>
302. **Whittaker G, Bui M, Helenius A. 1996.** The role of nuclear import and export in influenza virus infection. *Trends Cell Biol* 6(2): 67-71.
303. **Whitworth D, Newman S, Mundkur T, Harris P. 2007.** Wild birds and Avian Influenza. An introduction to applied field research and diseases sampling techniques. Food Alimentary Organization (FAO). División de Producción y Sanidad Animal. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1521e/a1521e.pdf>
304. **Widjaja L, Krauss SL, Webby RJ, Xie T, Webster RG. 2004.** Matrix gene of Influenza A Viruses isolated from wild aquatic birds: Ecology and Emergence of Influenza A Viruses. *J Virol* 78(16): 8771-8779.
305. **Winker K, Mccracken KG, Gibson DD, Pruett CL, Meier R, Huettman F, Wege M, Kulikova IV, Zhuravlev YN, Perdue ML, Spackman E, Suarez DL, Swayne DE. 2007.** Movements of birds and avian influenza from Asia into Alaska. *Emerg Infect Dis* 13: 547-552.
306. **Wood GW, Banks J, Strong I, Parsons G, Alexander DJ. 1996.** An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian Pathol* 25: 799–806.

307. **Woolcock PR, Mc Farland MD, Lai S, Chin RP. 2001.** Enhanced Recovery of Avian Influenza Virus Isolates by a combination of Chicken Embryo Inoculation Methods. Research Note. Avian Dis 45:1030-1035.
308. **Wrigh SM, Kawaoka Y, Sharp GB, Senne DA, Webster RG. 1992.** Interespecies transmission and reassortment of influenza A viruses in pigs and turkeys in the United States. Am J Epidemiol 136: 488-497.
309. **Yamamoto Y, Nakamura K, Okamatsu M, Miyasaki A, Yamada M, Mase M. 2008.** Detection Avian Influenza Virus (H5N1) in Domestic Duck Feathers. Emerging Infect Dis. 14(10): 1671-1672.
310. **Yee KS, Carpenter TE, et al. 2009.** “Epidemiology of H5N1 avian influenza”. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 32(4): 325-340.
311. **Zegarra VJ. 2009.** ¿Es la Influenza Aviar una verdadera amenaza para el país?: Aspectos epidemiológicos. Exposición. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. SENASA. Lima Perú. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en:
http://www.senasa.gob.pe/RepositorioAPS/0/1/JER/SANIAVI_PRINENFAVES/Es%20la%20influenza%20aviar%20una%20verdadera%20amenaza%20para%20el%20pa%20is%20Robin.pdf
312. **Zepeda C. 2007.** Highly pathogenic avian influenza in domestic poultry and wild birds: A risk analysis framework. Journal of Wildlife Dis 43(3): S51-S54.
313. **Ziegler AF, Dabison S, Acland H, Eckroade RJ. 1999.** Characteristic of H7N2 (nonpathogenic) avian influenza virus infections in commercial layers, in Pennsylvania, 1997-98. Avian Dis 43:142-149.

IX.- ANEXOS



Anexo 01. Grupos de animales usados para el desarrollo de la investigación



Anexo 02. Toma de muestras de hisopado cloacal de las aves centinelas



Anexo 03. Toma de muestra de sangre de las aves centinelas



Anexo 04. Procesamiento de las muestras de hisopado cloacal en laboratorio



Anexo 05. Ubicación de de los humedales de Puerto Viejo

Anexo 06. Plano de los humedales de Puerto Viejo

